

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
FIDDIENI SALIMA
NIM. 15630010



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
FIDDIENI SALIMA
NIM. 15630010

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
FIDDIENI SALIMA
NIM. 15630010

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 23 Oktober 2019

Pembimbing I



A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Pembimbing II



Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc
NIDT. 19900906 20180201 2 239

Mengetahui

Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
FIDDIENI SALIMA
NIM. 15630010

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Ditanyakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 23 Oktober 2019

Penguji Utama	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Ketua Penguji	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....)
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Anggota Penguji	: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc NIDT. 19900906 20180201 2 239	(.....)

Mengetahui
Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fiddieni Salima

NIM : 15630010

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil

Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 Oktober 2019

Yang membuat pernyataan,



Fiddieni Salima
NIM. 15630010

PERSEMBAHAN

Beberapa kata yang telah kurangkai ingin kupersembahkan teruntukmu,

Dengan beberapa “mu” yang kusayangi

Teruntukmu ayahanda dan ibunda tercinta, orang tua terbaik seluruh dunia

M.Musa Purwadi dan Kinarti

Teruntukmu kedua adikku tercinta dengan adanya mereka telah menjadi
semangatku

Zaki Abdul Muhaimin dan Dhiya’ul Haq

Teruntukmu teman temanku terkasihku, penyemangatku, penghiburku, yang
selalu ada untukku

Normal (Lala, Hasal, Sukijan, Fatachi, Aldi), Ciwi-ciwi (Azza, Maris, Nia),
Hydrilla squad (Mawaddah dan Bagas)

Teruntukmu, iya kamu, seseorang yang masih di rahasiakan oleh Allah SWT
untuk menemani separuh perjalananku, iya kamu, semoga itu kamu

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata*”**. Dalam menyelesaikan skripsi ini, ternyata tidak semudah yang dibayangkan sebelumnya. Namun, berkat dorongan, semangat, dan dukungan dari berbagai pihak merupakan kekuatan yang sangat besar hingga terselesaikannya skripsi ini. Khususnya dorongan dan semangat serta doa dari ayahanda M. Musa Purwadi dan ibunda Kinarti, S.Pd. Ayahanda dan ibunda merupakan inspirator dan pemacu penulis agar tidak pernah berhenti untuk menempuh cita-cita yang diharapkan.

Pada kesempatan kali ini penulis juga mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing utama, ibu Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc selaku pembimbing agama dan Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku konsultan yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan ilmu, nasehat serta perhatiannya hingga selesainya skripsi ini.
4. Seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal.

5. Seluruh teman-teman satu penelitian bahan alam, kimia A, teman pengurus Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaska) “Helium” periode 2016 dan 2017, serta seluruh teman-teman kimia angkatan 2015 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, namun tidak mengurangi arti keberadaan mereka

Sebagai seorang manusia dengan keterbatasan ilmu pengetahuan yang dikuasai, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari sempurna sehingga membutuhkan masukan dan kritikan yang bersifat membangun. Oleh karena itu penulis membuka luas bagi yang ingin menyumbangkan masukan dan kritikan demi kesempurnaan skripsi ini.

Akhir kata penulis berharap semoga Skripsi ini bermanfaat bagi penulis sendiri maupun pembaca. Terima kasih.

Malang, Oktober 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
LEMBAR ORISINALITAS	iv
PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
الملخص	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Hydrilla Verticillata</i>	8
2.2 Steroid	11
2.3 Isolasi Senyawa Steroid	13
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid	13
2.3.2 Hidrolisis dan Partisi	14
2.3.3 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom	16
2.3.4 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif	21
2.4 Uji Antioksidan <i>Hydrilla verticillata</i> dengan metode DPPH	23
2.5 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan UV-Vis	25
2.6 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan FTIR	26
2.7 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS	27
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	31
3.2 Alat dan Bahan	31
3.2.1 Alat	31
3.2.2 Bahan	31
3.3 Tahapan Penelitian	32
3.4 Cara Kerja	32
3.4.1 Preparasi Sampel	32
3.4.2 Penentuan Kadar Air Secara Termogravimetri	33
3.4.3 Ekstraksi Sampel	33

3.4.4 Hidrolisis dan Partisi	34
3.4.5 Uji Fitokimia	34
3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom	35
3.4.7 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLTA	36
3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH	36
3.4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH	36
3.4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel	36
3.4.9 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	37
3.4.10 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR	38
3.4.11 Identifikasi Menggunakan Instrumen LC-MS	38
3.5 Analisis Data	39
 BAB IV PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Sampel <i>Hydrilla verticillata</i>	40
4.2 Penentuan Kadar Air Secara Termogravimetri	40
4.3 Ekstraksi Sampel dengan Pelarut Metanol	41
4.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol <i>Hydrilla verticillata</i>	42
4.5 Partisi Ekstrak Metanol <i>Hydrilla verticillata</i>	43
4.6 Uji Fitokimia	43
4.7 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Kolom	44
4.8 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLTA	45
4.9 Uji Antioksidan Terhadap DPPH	47
4.9.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum	47
4.9.1 Pengukuran Potensi Antioksidan Isolat Steroid	47
4.10 Identifikasi Senyawa Steroid	49
4.10.1 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	49
4.10.2 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR	50
4.10.3 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer LC-MS/MS	51
4.11 Pemanfaatan <i>Hydrilla</i> dalam Prespektif Islam	55
 BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	59
 DAFTAR PUSTAKA	 32

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Hydrilla verticillata</i>	8
Gambar 2.2 Struktur Golongan Senyawa Steroid	12
Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida dan penetralan dengan natrium bikarbonat	16
Gambar 2.4 Struktur silika gel	18
Gambar 2.5 Struktur DPPH	23
Gambar 2.6 Reaksi radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan	24
Gambar 2.7 Hasil spektra UV-Vis isolat batang mengkudu	26
Gambar 2.8 Struktur ion prekursor dan ion produk	30
Gambar 2.9 Spektra LC-MS/MS alga cokelat	31
Gambar 4.1 Reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida	42
Gambar 4.2 Reaksi penetralan	42
Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia pada fraksi n-heksana	44
Gambar 4.4 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH	47
Gambar 4.5 Hasil spektra UV-Vis isolat steroid	49
Gambar 4.6 Hasil identifikasi isolat steroid menggunakan FTIR	51
Gambar 4.7 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid <i>hydrilla verticillata</i>	54
Gambar 4.8 Struktur ion prekursor dan ion produk	55

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada <i>Hydrilla verticillata</i>	10
Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut.....	13
Tabel 2.3 Hasil deteksi senyawa	30
Tabel 4.1 Hasil monitoring kromatografi kolom dengan KLTA	46
Tabel 4.2 Nilai persen (%) aktivitas antioksidan	48
Tabel 4.3 Interpretasi FTIR Isolat Steroid	51
Tabel 4.4 Hasil deteksi ion steroid oleh LC-MS/MS	52



LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	68
Lampiran 2 Diagram Alir	69
Lampiran 3 Perhitungan	76
Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan	81
Lampiran 5. Dokumentasi	90



ABSTRAK

Salima, Fiddieni. 2019. **Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana *Hydrilla Verticillata***. Laporan Hasil Penelitian. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc; Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc

Kata Kunci: *Hydrilla verticillata*, Steroid, Kromatografi Kolom, DPPH, UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

Hydrilla verticillata merupakan salah satu tumbuhan bawah permukaan air yang menjadi gulma perairan. Senyawa metabolit sekunder yang berada dalam *hydrilla* memiliki aktivitas antioksidan yaitu steroid. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid dan identifikasi senyawa steroid yang ada dalam isolat. Fraksi n-Heksana *hydrilla v.* dipisahkan menggunakan metode kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen n-heksana : etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30 mL. Isolat hasil kromatografi kolom dimonitoring menggunakan KLTA pada rentang vial ke 2 sampai vial 276. Profil fraksi golongan senyawa hasil kromatografi kolom menunjukkan terdapat satu isolat steroid terdapat pada vial ke 11 hingga 20. Hasil isolat steroid di uji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dengan parameter nilai EC_{50} . Identifikasi isolat steroid menggunakan UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS. Hasil penelitian menunjukkan isolat steroid hasil kromatografi kolom dapat digunakan sebagai senyawa antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 24,48 ppm. Hasil pengujian UV-Vis menunjukkan isolat steroid menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 206 nm adanya ikatan rangkap C=C tidak terkonjugasi, hasil pengujian FTIR menunjukkan gugus fungsi O-H, C=C, C=O, -CH₃, dan -CH₂, dan hasil pengujian LC-MS/MS menunjukkan adanya dua senyawa yaitu β -sitosterol dan stigmasterol.

ABSTRACT

Salima, Fiddieni. 2019. **Antioxidant Activity Test of Steroid Isolates from Chromatography of *Hydrilla Verticillata* n-Hexane Faction Column**. Research Report. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University, Malang. Advisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Advisor II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc; Consultant: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keywords: *Hydrilla verticillata*, Steroids, Coloumn chromatgraphy, DPPH, UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

Hydrilla verticillata is one of the underwater plants that becomes aquatic weeds. Secondary metabolites in hydrilla have antioxidant activity, steroids. So this study aims to determine the antioxidant activity of steroid isolates and identify the steroid compounds present in isolates. N-Hexane hydrilla *verticillata* fraction. separated using column chromatography method with variations in the eluent n-hexane gradient: ethyl acetate 95: 5; 90:10; 85:15; 80: 20; 75:25; 70:30 mL. Isolate column chromatography results were monitored using KLTA in the second range of the vial to 276 vial. The profile of the compound group fraction from column chromatography showed that there was one steroid isolate in vial 11th to 20th steroid isolates using the DPPH method with EC₅₀ value parameters. . Identification of steroid isolates using UV-Vis, FTIR, and LC-MS / MS. The results showed that steroid isolates from column chromatography could be used as antioxidants as the EC50 values of 24,48 ppm. The UV-Vis test results showed that steroid isolates produced maximum absorption at 206 nm wavelength. The presence of C = C double bonds was not conjugated, FTIR test results showed functional groups OH, C = C, C = O, -CH₃, and -CH₂, and the results LC-MS / MS testing showed two compounds namely β -sitosterol and stigmasterol.

الملخص

سليمة, في الدين. ٢٠١٩. اختبار نشاط مضادات الأكسدة لعزل الستيرويد نتائج من كروماتوجرافي كولوم
الفرکسي هيکسان هيدريلا فرتجيلا. المشرف الأول : احمد غنائم فشا, الملجستير؛ الشرفة الثانية: لؤلؤة
الحميدة العلي, الماجستير؛ المستشار: احمد حنفي, الماجستير.

الكلمات الرئيسية : هيدريلا فرتجيلا, ستيرويد, كروماتوجرافيا كولوم, DPPH,

UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

هيدريلا فرتجيلا هو واحد من النباتات المائية التي تصبغ لعشاب المائية. الأيض
الثانوي في هيدريلا فرتجيلا لديه النشاط للأكسدة هي الستيرويد. لذلك تمهد هذه البحث
لتعريف النشاط الأكسدة لعزل الستيرويد وتحديد مركبات الستيرويد في العزلات. تنقسم الفرکسي
هيکسان هيدريلا فرتجيلا باستخدام الطريقة كروماتوجرافي كولوم و اختلافات التدرج شاطئ رصد
العزل نتيجة العمود اللوني باستخدام n-heksana:etil asetat ٩٥:٥; ١٠:٩٠; ١٥:٨٥; ٢٠:٨٠;
٢٥:٧٥; ٣٠:٧٠ mL في النطاق الثاني من قارورة إلى قارورة ٢٧٦. يوضح ملامح فرقة الجزء المجموع
الدركب نتيجة من تحليل العمود اللون أن الشاطئ الستيرويد في KLTA مواضع ١١-٢٠.
مجموعة الس تيرويد بسبب سميته باس تخدام طريقة اختبار نشاط مضادات الأكسدة باستخدام
الطريقة DPPH مع معايير EC₅₀. تحديد المنشطات المشتبه بها باستخدام FTIR و LC-MS/MS
و UV-Vis.

نتائج البحث هو لعزل الستيرويد نتائج من كروماتوجرافي كولوم يستطيع أن يستخدم
كمركب مضاد للأكسدة ونتائجه ٢٤,٤٨ الوف. نتائج UV-Vis هو حصّل لعزل الستيرويد أقصى
امتصاص عند الطول الموجي ٢٠٦ nm. كان علاقة تكرار C=C لا متوافق. نتائج FTIR هو
مجموعة وظيفية -CH₂, -CH₃, C=O, C=C, O-H. و نتائج LC-MS/MS هو مركبان β-
sitosterol stigmasterol

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kekayaan alam Indonesia sangat melimpah, beragam flora dan fauna yang bermacam-macam di darat maupun di laut. Allah SWT menciptakan kekayaan alam ini semata-mata untuk kepentingan kehidupan manusia agar manusia selalu bersyukur dan mengingat kekuasaan-Nya atas apa yang telah diberikan, sebagai mana firman Allah dalam surat as Syu'ara ayat 7.

أَوَمْ يَرَوْنَ إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”

Surat tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan tumbuhan dengan memiliki banyak manfaat dan tak terhitung jumlahnya. Baik itu tumbuhan yang hidup di darat maupun di air. Manusia yang diciptakan sebagai khalifah di bumi, diharapkan mengetahui dan memanfaatkan dengan baik potensi yang dimiliki tumbuhan itu. Adapun manfaatnya bisa digunakan dalam berbagai keperluan, seperti sebagai bahan makanan, kosmetik, obat-obatan, dan sebagainya. Salah satu tumbuhan tingkat rendah yang memiliki banyak manfaat adalah *Hydrilla verticillata*.

Hydrilla verticillata merupakan jenis tumbuhan yang berwarna hijau, sehingga terkandung banyak klorofil di dalamnya. *Hydrilla verticillata* memiliki kandungan klorofil total sebesar 4,43 mg/L, karotenoid 0,92 mg/L dan vitamin C 4,70 mg/30g (Kurniawan, 2010). Menurut Tanor (2004) Tumbuhan ini seluruh bagian tubuhnya tenggelam di bawah permukaan air dan mempunyai permukaan

tubuh yang sangat luas. Kandungan nutrisi *hydrilla verticillata* yaitu 1,74% protein, 0,54% lemak, 1,82% serat kasar, 1,51% abu, 3,97% karbohidrat dan 90,42% air.

Senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan *Hydrilla verticillata* sangat bermanfaat bagi kehidupan manusia, salah satunya adalah zat antioksidan yang berperan penting dalam pencegahan oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit karsinogenik dan panuan (Yan, dkk. 1998 dalam Ikfi, dkk. 2017). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Pal dan Nimse (2006) *Hydrilla* memiliki kandungan saponin, β -karoten, vitamin, dan mineral. Penelitian lain yang dilakukan Kensa dan Neelamegam (2015) menyebutkan hasil skrining *Hydrilla* mengandung senyawa flavonoid, glikoida, saponin, dan steroid/terpenoid.

Kandungan senyawa aktif *Hydrilla verticillata* dapat diperoleh dengan cara ekstraksi maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut berdasarkan prinsip *like dissolve like* yaitu senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar sedangkan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Pada proses maserasi, perlu dilakukan pengadukan. Pengadukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel (Lenny, 2006). Hafiz, dkk. (2017) telah melakukan ekstraksi maserasi *Hydrilla verticillata*, dengan menggunakan variasi pelarut antara lain metanol (polar),

kloroform (semi polar), dan n-heksana (non polar). Hasil randemen yang didapat pada pelarut metanol sebesar 12,72 %, kloroform didapat randemen yang lebih kecil yaitu sebesar 4,96 %, pada pelarut n-heksana didapatkan randemen paling kecil yaitu sebesar 3,80 %. Menurut Lenny (2006) pelarut yang paling sering digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam adalah pelarut golongan alkohol, karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder. Pelarut metanol dipilih karena memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah diuapkan pada suhu yang lebih rendah.

Pemisahan yang lebih spesifik pada penelitian ini yaitu dengan cara hidrolisis untuk memutuskan ikatan antara glikon dan steroid (Handoko, 2016). Sebagaimana penelitian Khalaf, dkk. (2011) bahwa senyawa sterol yang merupakan salah satu jenis steroid ditemukan di tumbuhan dalam keadaan berikatan dengan gula. Pemutusan ikatan glikosida menjadi steroid dan glikon dapat dilakukan dengan hidrolisis menggunakan larutan HCl 2 N (sebagai katalis) dimana HCl merupakan asam kuat yang mudah melepas ion H^+ secara sempurna dalam air (Handoko, 2016).

Setelah ikatan glikosida terputus dilakukan partisi untuk memisahkan steroid dari glikon (gula). Partisi dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut nonpolar, sehingga diharapkan senyawa steroid akan lebih terdistribusi pada fase nonpolar dan terpisah dengan senyawa polar (Handoko, 2016). Seperti penelitian Sinulingga (2011) menyatakan bahwa ekstrak n-heksana akar tanaman ekor naga mengandung senyawa triterpenoid atau steroid. Hasil penelitian lainnya Hafis, dkk (2017) menggunakan pelarut n-heksana dengan hasil pengujian fitokimia pada *hydrilla verticillata* menunjukkan adanya senyawa triterpenoid atau steroid.

Berdasarkan penelitian tersebut pemilihan pelarut sangat berpengaruh terhadap senyawa aktif yang akan diambil. Pemilihan n-heksana sebagai pelarut didasarkan pada sifat nonpolar dengan ketetapan dielektrik 1,89 sehingga mempunyai kemampuan untuk menarik senyawa steroid yang bersifat nonpolar dalam sampel. Selain itu, didasarkan pada tingkat keamanan dan kemudahan saat penguapan (Zahro, 2011).

Isolasi senyawa steroid lebih lanjut dapat dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan salah satu teknik untuk memisahkan senyawa aktif dari sampel bahan alam (Atun, 2014). Pemisahan senyawa aktif pada kromatografi kolom salah satunya dipengaruhi oleh adanya eluen atau fase gerak (Rahmawati. Dkk, 2017). Sundari (2010) mengatakan pelarut sebagai fasa gerak atau eluen merupakan salah satu faktor yang menentukan gerak komponen-komponen dalam suatu campuran. Pelarut n-heksana mempunyai kemampuan mengambil senyawa dengan kepolaran rendah, sedangkan pelarut yang lebih polar etil asetat digunakan untuk mengambil senyawa yang lebih polar (Rusdi, 1990 dalam Rahmawati, 2017). Berdasarkan penelitian Rahmawati, dkk (2017) yang melakukan isolasi senyawa steroid menggunakan perbandingan komposisi eluen n-heksana : etil asetat yaitu 16:4 ; 17:4 ; 18:2. Variasi eluen 16:4 menghasilkan 1 noda tunggal steroid dengan rendemen 4,6% pada botol vial 9 dan 10. Variasi eluen 17:3 menghasilkan 3 noda tunggal dengan rendemen 3,3% pada botol vial 9 dan 10, sedangkan pada variasi eluen 18:2 memberikan 1 noda tunggal dengan rendemen 4,4% pada botol vial 12-19 dan menghasilkan noda tunggal dengan rendemen 5,8% pada botol vial 50-65. Menurut penelitian Sukandana (2011) menggunakan kromatografi kolom

dengan adsorben silika gel 60. Fraksi yang diperoleh sebanyak 14 fraksi dan terdapat 11 fraksi yang menunjukkan positif steroid.

Fraksi-fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis untuk melihat noda dengan Rf yang sama. Mulyani, dkk., (2013) menyatakan bahwa fraksi-fraksi yang memiliki noda dan nilai Rf (*retardation factor*) yang sama pada kromatografi lapis tipis digabung dan diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan fraksi yang lebih sederhana. Hasil monitoring secara KLTA dilihat profil pemisahan komponennya pada plat KLT. Menurut penelitian yang dilakukan Baderos, dkk (2017) monitoring dengan kromatografi lapis tipis menunjukkan variasi eluen terbaik yaitu 17:3 karena menghasilkan lebih banyak pemisahan senyawa steroid yang ditandai dengan semakin banyaknya noda tunggal yang dihasilkan.

Pengujian aktivitas dari senyawa steroid *Hydrilla verticillata* dilakukan uji antioksidan. Adapun metode yang dilakukan dalam pengujian ini adalah metode *Diphenyl picryl hydrazyl* (DPPH). Pengujian metode DPPH ini dilakukan untuk mengetahui nilai EC₅₀ (*Effective concentration*), yang merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal sebanyak 50%. Menurut hasil penelitian Ikfi, dkk. (2017) uji antioksidan pada tumbuhan *Hydrilla verticillata* dengan menggunakan pelarut metanol, kloroform, dan n-heksana diperoleh nilai EC₅₀ masing-masing 256,6 ppm; 457,6 ppm; 2763 ppm. Dinasti, dkk. (2016) melakukan penelitian uji aktivitas antioksidan terhadap senyawa steroid pada mikroalga *Chorella sp.* Menghasilkan nilai EC₅₀ sebesar 77,78 ppm dimana menurut Wulandari (2013), dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai EC₅₀ kurang dari 50, dikatakan kuat jika nilai EC₅₀ antara 50

– 100, dikatakan sedang ketika nilai EC_{50} antara 100 – 150, dan dikatakan lemah jika nilai EC_{50} antara 151 – 200.

Fraksi n-heksana dan isolat steroid yang diperoleh akan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS untuk mengetahui jenis steroid yang terdapat pada *Hydrilla verticillata*. Bauzidi, dkk. (2014) melakukan penelitian pada alga coklat *Cytoseira foeniculacea* dengan hasil deteksi steroid dengan golongan fukosterol. Lopez, dkk. (2011) meneliti kandungan steroid pada rumput laut, salah satunya alga merah (*Rhodophyceae*) dengan memunculkan sinyal pada steroid jenis desmosterol, kampesterol, kolesterol, fukosterol, β -sitosterol, dan stigmasterol.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil uji aktivitas antioksidan pada isolat steroid hasil Kromatografi Kolom ekstrak n-heksana *Hydrilla Verticillata*?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa aktif steroid hasil pemisahan tersebut menggunakan UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui hasil uji aktivitas antioksidan pada isolat steroid hasil Kromatografi Kolom ekstrak n-heksana *Hydrilla Verticillata*.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa aktif steroid hasil pemisahan tersebut menggunakan UV-Vis, FTIR dan LC-MS?

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah yang diambil yaitu :

1. Sampel yang digunakan berasal dari Danau Ranu Kabupaten Pasuruan.

2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut n-heksana.
3. Pemisahan senyawa steroid menggunakan metode kromatografi kolom.
4. Uji antiosidan dilakukan menggunakan metode DPPH dengan menghitung nilai EC_{50} .
5. Identifikasi senyawa aktif menggunakan instrumen UV-Vis, FTIR dan LC-MS

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai potensi antioksidan isolat steroid *Hydrilla Verticillata* sehingga dapat dimanfaatkan pada masyarakat luas dan di bidang farmakologi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hydrilla Verticillata

Hydrilla verticillata adalah tumbuhan air yang merupakan bagian dari ekosistem danau dan berperan sebagai sumber daya baik langsung maupun tidak langsung (Tanor, 2004). Tumbuhan air adalah tumbuhan yang tumbuh di air atau sebagian siklus hidupnya berada di air. Keberadaan tumbuhan air di perairan terbuka tidak selalu menimbulkan kerugian. *Hydrilla verticillata* hidup secara submersum dan sering terdapat pada perairan-perairan tergenang seperti danau atau waduk (Shofawie, 1990).



Gambar 2.1 *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata memiliki ciri-ciri yaitu, daun berukuran kecil berbentuk lanset yang tersusun mengelilingi batang. Batangnya bercabang dan tumbuh mendatar sebagai stolon yang pada tempat tertentu membentuk akar serabut (Silalahi, 2010). Batang *hydrilla* berwarna hijau, tegak, ramping, bercabang dan dapat tumbuh sepanjang 7 m. Bunganya jarang ada, apabila ada akan tumbuh pada ketiak daun menuju permukaan air melalui tangkai bunga yang panjang, berwarna putih dengan 3 mahkota dan 3 kelopak. Daun *hydrilla* berwarna hijau, tipis, berbentuk lanset dengan tepi bergerigi dan berduri, lebar 2-4 mm dan panjang 6-

20 mm, setiap tiga sampai empat helai daun tumbuh melingkar dan membentuk ruas-ruas pada batang. Tangkai daun berdiameter 0,1 mm dan berwarna hijau. Pelepeh daun sering berwarna merah dan memiliki satu duri di bawah permukaannya (Marer dan Garvey, 2001). Tumbuhan ini merupakan tumbuhan yang seluruh bagian tubuhnya tenggelam di bawah permukaan air. Tumbuhan hydrilla memiliki sistematika sebagai berikut (Ramesh, Rajan dan Sathanam, 2014):

Kingdom	: Plantae
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Hydrocharitales
Famili	: Hydrocharitaceae
Genus	: Hydrilla
Spesies	: <i>Hydrilla verticillata</i>

Tumbuhan *Hydrilla verticillata* mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi seperti saponin, β -karoten, polisakarida, asam amino, mikro dan makronutrien, antioksidan dan agen detoksifikasi (Pal dan Nimse, 2006). Selain itu, kandungan klorofilnya sebesar 4,43 mg/g, karotenoid 0,92 mg/g dan vitamin C 4,70 mg/30g. Spesies ini juga kaya akan lisin dan merupakan sumber potensial dari kalsium dan vitamin B₁₂ (Kurniawan, dkk., 2010). *Hydrilla* dapat mendukung sistem kekebalan tubuh, memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan dan antitumor (Ramesh, Rajan & Sathanam, 2014).

Berdasarkan kandungan yang berpotensi pada tumbuhan *Hydrilla verticillata*, menunjukkan bahwa semua makhluk ciptaan Allah memiliki kegunaan yang dapat dimanfaatkan dengan baik oleh manusia seperti pada al-Quran surat al-Baqarah ayat 29:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ
سَبْعَ سَمَاوَاتٍ ۚ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

“Dialah Allah, yang menjadikan segala yang ada di bumi untuk kamu dan Dia berkehendak (menciptakan) langit, lalu dijadikan-Nya tujuh langit. Dan Dia Maha Mengetahui segala sesuatu”.

Menurut tafsir Jalalain ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan bumi beserta isinya agar kamu memperoleh manfaat dan mengambil perbandingan darinya. Berdasarkan tafsir tersebut Allah SWT menciptakan segala sesuatu di muka bumi dengan tidak sia-sia. Semua makhluk yang ada di dunia ini diciptakan tidak semata mata hanya untuk melengkapi isi langit dan bumi, tapi segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah dapat memberikan manfaat, dengan terungkapnya rahasia-rahasia Allah melalui hasil penelitian akan menambah keyakinan akan kebesaran dan kekuasaan Allah. Salah satunya dengan memanfaatkan kandungan yang ada pada tumbuhan *Hydrilla verticillata*.

Adapun kandungan senyawa kimia yang lain dalam *Hydrilla verticillata* ditunjukkan pada Tabel 2.1(Pal dan Nimse, 2006):

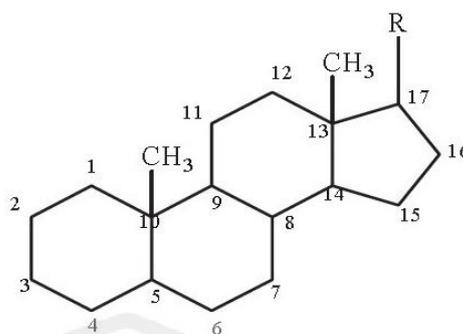
Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada *hydrilla verticillata*

Nutrisi / Mineral	Jumlah (mg/10,5 gr)	Nutrisi/Mineral	Jumlah (mg/10,5 gr)
Vitamin B-1	26,2	Fosfor	29,7
Vitamin B-2	0,08	Besi	35,8
Vitamin B-3	5,2	Seng	6,3
Vitamin B-5	11,4	Mangan	24,5
Vitamin B-6	35,9	Tembaga	0,2
Vitamin B-12	1,1	Kobalt	0,4
Kalsium	1460	Molibdenum	15 µg/10,5 g
Magnesium	76,1	B-karoten	19600 IU/10,5 g
Potassium	245		

Beberapa penelitian tentang isolasi senyawa kimia dari hydrilla juga dilakukan, diantaranya didapatkan senyawa kimia seperti loliolide, thymidin, asam oktadekanadioat (Xiao, dkk. 2007). Byju, dkk (2012) juga mengemukakan adanya senyawa phytol, 3-octen-2-one,7-methyl, hexyl tetradecyl ester, dan 2-hexadecen-1-ol,3,5,11,15-tetrametil. Selain itu, diperoleh juga senyawa asam linoleat, asam heksadekanadioat, dan asam oktadekatrienoat (Prabha dan Rajkumar, 2015). Menurut penelitian Das, dkk (2015) melarutkan *Hydrilla verticillata* dengan pelarut petroleum eter yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid dan diterpenoid. Hasil penelitian dari Hafis, dkk (2017) menggunakan pelarut n-heksana dengan hasil pengujian fitokimia pada *Hydrilla verticillata* menunjukkan adanya senyawa triterpenoid atau steroid.

2.2 Steroid

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi, 1994). Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Beberapa senyawa steroid mengandung gugus -OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid (Robinson, 1995).



Gambar 2.2 Struktur Golongan Senyawa Steroid

Senyawa steroid yang berada ditumbuhan disebut dengan fitosterol, sementara yang terdapat pada hewan disebut zoolesterol, dan di fungi disebut mikosterol (Vembriarto, 2013). Fungsi dari senyawa steroid selain sebagai pelindung diri, juga berfungsi sebagai hormone, kolesterol. Ergosterol, progesterone, dan estrogen, yang semuanya merupakan senyawa turunan steroid (Poedjiadi, 2012). Senyawa steroid dapat digunakan sebagai senyawa antioksidan (Krisna, 2014), antikanker (Diasuti, 2010), (Zhang dkk., 2012), serta digunakan sebagai senyawa toksik (Sapar, 2004).

2.3 Isolasi Senyawa Steroid

Isolasi senyawa steroid dari *hydrilla verticillata* dapat dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut

2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid

Ekstraksi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan komponen yang ada didalam suatu sampel. Pada penelitian ini proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Pada proses perendaman, dinding serta membran sel analit tumbuhan akan terpecah akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel. Hal tersebut mengakibatkan metabolit sekunder yang ada

dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Lama perendaman yang diatur akan menghasilkan ekstraksi yang sempurna. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Indrayani, 2006).

Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana (Mustofa, 2008). Metode ini tidak menggunakan pemanasan, sehingga zat aktif yang terkandung dalam bahan tidak rusak. (Voight, 1994). Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum, pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006). Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat polaritas pelarut yang ditentukan oleh konstanta dielektrikum yang ditampilkan pada Tabel 2.2:

Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut

Jenis Pelarut	Konstanta Dielektrum	Tingkat Kelarutan dalam Air	Titik Didih (C°)
Heksana	1,9	TL	68,7
Petroleum eter	2,28	TL	60
Benzena	2,38	TL	80,1
Toluena	4,81	TL	111
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metil asetat	6,68	S	57
Metil Klorida	9,08	S	39,75
Butanol	15,80	S	117,2
Propanol	20,1	L	97,22
Aseton	20,70	L	56,2
Etanol	24,30	L	78,5
Metanol	33,60	L	64
Air	78,4	L	100

* Keterangan: TL = tidak larut; S = sedikit larut; L = larut dalam berbagai proporsi

Proses maserasi *Hydrilla verticillata*. pada penelitian ini menggunakan pelarut metanol. Penggunaan metanol dikarenakan sifat kepolaran dari metanol polar dan universal. Selain itu, banyak ditemukan dalam jaringan tanaman yang terdapat sebagai glikosida. Pemilihan metanol sebagai pelarut utama dalam maserasi yang akan dilakukan juga tidak lepas dari hasil penelitian sebelumnya. Menurut Amaliyah (2013), melakukan penelitian untuk menguji toksisitas mikroalga *Chlorella sp.* dengan mengekstrak biomassa *Chlorella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu metanol, etil asetat dan n-heksana. Randemen tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol yaitu sebesar 7,001 %. Desianti, dkk., (2014) dalam penelitiannya juga menyatakan ekstrak metanol yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas paling tinggi adalah golongan senyawa steroid.

Senyawa steroid yang terdapat pada *Hydrilla verticillata*. tidak dalam keadaan bebas, akan tetapi berikatan dengan gugus glikosida. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan gula (glikon) yang mempunyai sifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang mempunyai sifat polar, semipolar dan nonpolar (Gunawan, 2004). Untuk memutuskan gugus glikosida yang terdapat pada steroid perlu dilakukan pemisahan secara berlanjut yaitu dengan hidrolisis dan partisi.

2.3.2 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis merupakan reaksi antara senyawa dan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan. Selain bereaksi, peran air adalah sebagai medium reaksi sedangkan senyawanya dapat berupa senyawa anorganik maupun senyawa organik (Mulyono, 2006). Reaksi hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan

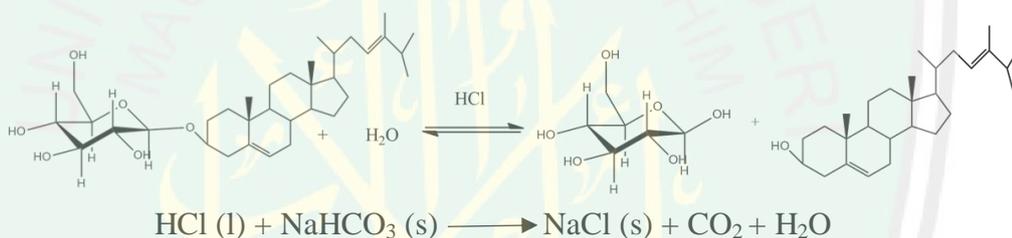
glikosida pada senyawa organik yang berada pada bentuk glikosidanya. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan gula (glikon) yang mempunyai sifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang mempunyai sifat polar, semipolar dan nonpolar (Gunawan, 2004).

Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui reaksi menggunakan air (H_2O) sehingga membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhiatama, dkk., 2012). Namun, reaksi hidrolisis memerlukan bantuan katalisator karena hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat (Nihlati, dkk., 2008). Oleh karena itu pada penelitian ini akan menggunakan HCl sebagai agen penghidrolisis. Pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006).

Penggunaan asam kuat seperti HCl pada proses hidrolisis menurut Wahyudi, dkk., (2013) lebih baik dibanding menggunakan H_2SO_4 karena sifatnya yang lebih reaktif. Selain itu, katalisator asam klorida (HCl) akan membentuk garam yang tidak berbahaya yakni NaCl (Nihlati, dkk., 2008). Afif (2013) menggunakan metode hidrolisis dengan pelarut HCl 2 N sebagai katalis dan ekstraksi cair-cair untuk mengekstrak metabolit sekunder dari ekstrak metanol alga merah *E. contoni* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu 1-butanol, etil asetat, kloroform, n-heksana dan petroleum eter. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak setelah

dihidrolisis dan dipartisi memiliki nilai LC50 lebih rendah (70,32 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak hasil hidrolisis dan partisi lebih bersifat toksik.

Hasil hidrolisis akan dilakukan partisi menggunakan pelarut n-Heksana. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan Anggraeni (2014) nilai randemen yang terbaik dari hasil partisi variasi pelarut etil asetat, kloroform, n-heksana dan petroleum eter menunjukkan nilai randemen terbaik yaitu pada pelarut n-heksana sebesar 45,61 % (b/b) dan petroleum eter sebesar 8,1854 % (b/b). akan tetapi pada uji antioksidan aktivitas dan EC50 tertinggi ditunjukkan pada ekstrak petroleum eter sebesar 64,8839 % pada 30 ppm.



Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan *O-glikosida* dan penetralan dengan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

2.3.2 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan preparatif. Metode ini digunakan untuk memisahkan suatu sampel yang berupa campuran dengan berat beberapa gram. Prinsip dasar dari kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi. Pemisahan dapat dilakukan dengan meletakkan sampel sampel pada ujung atas kolom dan pelarut yang digunakan dialirkan secara terus menerus. Eleuen/pelarut akan melewati kolom dengan adanya gravitasi bumi atau karena bantuan tekanan (Kristanti, dkk., 2008).

Menurut Kondeti (2014), untuk memaksimalkan proses pemisahan pada kromatografi kolom, perlu dilakukan peningkatan teknik kromatografi kolom dari segi kualitas maupun kuantitas, misalnya dengan mengubah ukuran kolom, ukuran partikel pada fase diam, komposisi fase gerak, dan lain-lain. Fase gerak yang digunakan harus sudah ditentukan sebelumnya agar diperoleh pola pemisahan yang diinginkan, karena kromatografi kolom memerlukan waktu lama dan bahan yang cukup banyak. Ada tiga pendekatan yang digunakan untuk memecahkan masalah ini yaitu dengan penelusuran pustaka, penerapan data KLT pada pemisahan dengan kolom dan dengan pemakaian elusi landaian umum mulai dari pelarut non-polar sampai pelarut polar (Sastrohamidjojo, 1985).

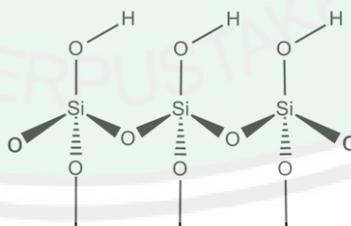
Pemilihan fasa gerak juga merupakan langkah yang penting untuk keberhasilan isolasi senyawa. Sifat-sifat pelarut juga sangat berpengaruh terhadap penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Kemampuan pelarut untuk menggerakkan suatu senyawa berhubungan dengan kekuatan elusi pelarut. Urutan kekuatan elusi beberapa pelarut air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter (Atun, 2014).

Silika gel adalah fase diam (adsorben) yang paling sering digunakan untuk pemisahan produk alam (Cannel, 1998). Banyaknya adsorben yang digunakan bergantung pada tingkat kesulitan pemisahan dari suatu senyawa dan jumlah sampel yang akan dipisahkan. Secara umum, tiap gram sampel yang dipisahkan membutuhkan adsorben 30 – 50 gram. Jika pemisahan yang dilakukan cukup sulit, jumlah adsorben yang dibutuhkan dapat mencapai 200 gram. Jumlah adsorben

yang dibutuhkan akan lebih sedikit untuk pemisahan senyawa-senyawa yang perbedaan kepolarannya cukup besar (Kristanti, dkk., 2008).

Permukaan silika gel mengandung gugus silanol. Gugus hidroksil ini merupakan pusat aktif dan berpotensi dapat membentuk ikatan hidrogen kuat dengan senyawa yang dipisahkan. Silika gel membentuk ikatan hidrogen terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol, amina, amida, dan asam karboksilat (Palleros, 2000). Semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu senyawa, semakin kuat akan tertahan oleh silika gel. Seberapa kuat senyawa tertahan dalam silika gel tergantung pada kepolaran fase gerak. Semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu solven, semakin baik eluen untuk melulusi senyawa polar yang teradsorb pada kolom silika gel (Cannel, 1998). Kepolaran adsorben dalam kromatografi menurut Noviyanti (2010) aluminium oksida (alumina) > florisil (magnesium silikat) > asam silika (silica gel) > gula > selulosa.

Fase diam yang digunakan pada proses pemisahan kromatografi kolom adalah silika gel G-60 (0,063 – 0,200 mm) (Noviyanti, dkk., 2010). Adapun struktur dasar silika gel dapat dilihat pada gambar 2.4 (Noviyanti, dkk., 2010):



Gambar 2.4 Struktur silica gel

Pengisian adsorben dalam kolom dapat dilakukan dengan cara membuat campuran antara adsorben dengan eluen yang akan digunakan untuk elusi. Campuran dibuat dengan kekentalan tertentu agar dapat dituang dalam kolom. Adsorben ditambahkan pada pelarut sedikit demi sedikit agar tidak terjadi

gumpalan dalam campuran. Campuran yang terbentuk dimasukkan dalam kolom menggunakan corong. Selama proses pemasukan adsorben campuran, dinding kolom diketuk-ketuk agar lapisan yang terbentuk benar-benar mampat dan juga tidak terdapat gelembung. Kran bagian bawah dari kolom dibuka untuk mengeluarkan pelarut. Langkah tersebut diulang sampai seluruh adsorben yang akan digunakan untuk elusi berhasil dimasukkan dalam kolom. Setelah itu, ditunggu cairan yang berada di atas adsorben sampai jernih (Kristanti, dkk., 2008).

Saleh (2007) memisahkan ekstrak metanol fraksi kloroform dari akar tumbuhan *S. album* yang menunjukkan positif steroid dengan cara kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* 60 (70 – 230 mesh; 66,67 g) dengan panjang kolom 40 cm, diameter 2,5 cm dan dielusi secara isokratik dengan pelarut n-heksana:etil asetat (82:18) dengan penampungan 5 mL setiap fraksi menghasilkan 170 fraksi. Hasil penelitian menunjukkan fraksi ke 52 – 59 positif steroid terhadap pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB). Bogoriani (2008) melakukan isolasi glikosida steroid menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan fasa diam silika gel 60 (70 – 230 mesh) dan dielusi menggunakan fase gerak campuran kloroform, metanol, dan air (3:1:0,1). Fraksi ditampung setiap 3 mL menghasilkan 50 fraksi. Hasil penelitian menunjukkan tiga kelompok fraksi (A, B, C) dimana fraksi-fraksi B menampakkan satu noda melalui uji kemurnian dan positif terhadap saponin steroid. Sementara itu, (Verma, dkk., 2013) melakukan isolasi dan pemurnian saponin-steroid dari ekstrak daun *Asparagus racemosus* secara kromatografi kolom, menggunakan fase diam *silica*

gel (230 – 400 mesh) dan dielusi dengan kloroform:metanol (6:4). Hasil penelitian menunjukkan senyawa hasil isolasi positif saponin-steroid terhadap LB.

Isolasi steroid dari *Chlorella sp.* dengan kromatografi kolom, hasil yang diperoleh dari proses elusi kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah dilakukan hingga diperoleh isolat sebanyak 214 vial, yang dijadikan dalam 11 fraksi besar. Dari 11 fraksi yang didapat, diperoleh 1 fraksi murni yang diduga senyawa steroid pada vial ke-6 sampai vial ke-10 dan diperoleh sebanyak 7,7 mg dari 5 vial yang murni senyawa steroid tersebut (Handoko, 2016). Perbandingan eluen terbaik untuk n-heksana : etil asetat dari perbandingan (100:0), (90:10), (80:20), (70:30), (60:40), (50:50), (40:60), dan (30:70) paling bagus adalah pada perbandingan (80:20) atau pada perbandingan (4:1) yang memisahkan senyawa aktif baik steroid atau triterpenoid paling banyak, pada isolat F3 diperoleh isolat berwarna ungu setelah disinari sinar Uv yang menunjukkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid pada akar tanaman ekor naga (Sinulingga, 2011). Perbandingan 4,25:0,75 yang dilakukan Sholikah (2016) pada *Eucheuma spinosum* diperoleh 9 kelompok fraksi dengan 5 kelompok fraksi senyawa steroid dan 4 kelompok fraksi senyawa triterpenoid.

Semua fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom selanjutnya dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis untuk melihat noda dengan Rf yang sama. Fraksi-fraksi dengan noda yang sama pada kromatografi lapis tipis digabungkan dan diuapkan pelarutnya (Saleh, 2007). Hal yang sama juga diutarakan oleh Mulyani, dkk., (2013) yang menyatakan bahwa fraksi yang memiliki noda dan nilai Rf (*retention factor*) yang sama digabung sehingga didapatkan fraksi yang lebih sederhana. Selanjutnya, semua fraksi yang telah didapatkan pada

kromatografi kolom ini diperiksa senyawa metabolit sekundernya dan dilihat juga pola pemisahan komponennya pada plat KLT.

2.4 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu alat pemisah dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif (Stahl, 1985). Analisis kualitatif KLT didasarkan pada nilai R_f , dimana dua senyawa dapat dikatakan identik (sama) bila mempunyai nilai R_f yang sama. Analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur luas spot atau pengerokan secara langsung terhadap spot lalu penentuan kadar senyawa yang terdapat dalam spot tersebut dengan metode analisis lain (Gandjar dan Rohman, 2009). Analisis KLT dilakukan untuk menentukan pelarut yang terbaik untuk kromatografi kolom, analisis fraksi-fraksi hasil kolom (Sulastry dan Kurniawati, 2010), (Kusmiyati, dkk., 2011). Pada penelitian ini, pengujian KLT dilakukan untuk memonitor hasil pemisahan kromatografi kolom dan identifikasi senyawa steroid maupun triterpenoid.

Teknik pemisahan KLT menggunakan prinsip distribusi suatu senyawa pada fasa diam dan fasa gerak yang didasarkan pada perbedaan kepolaran dengan menggunakan plat KLT yang terdapat lapisan tipis di atasnya yaitu plat silika gel F254 ditambahkan indikator fluoresensi yang dapat membantu kenampakan bercak berwarna pada lapisan tersebut. Indikator fluoresensi pada plat silika gel F254 merupakan senyawa yang mampu memancarkan sinar dengan lampu UV (Gritter, 1991). Identifikasi dari senyawa yang telah terpisah dapat dilakukan

menggunakan nilai R_f sebagai dasar penggabungan isolat hasil kromatografi kolom yang mempunyai nilai R_f sama dengan persamaan (Kusmiyati, dkk., 2011):

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

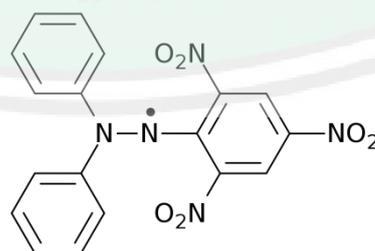
Keberhasilan dalam pemisahan steroid dan triterpenoid dari komponen yang lainnya pada monitoring KLT didasarkan pada pemilihan fase gerak. Pada penelitian ini menggunakan campuran pelarut n-heksana dan etil asetat sebagai fase gerak, senyawa n-heksana yang bersifat non-polar dan senyawa etil asetat yang bersifat semi polar. Perbandingan dari campuran eluen tersebut, n-heksana mempunyai perbandingan yang lebih besar sehingga memberikan kontribusi yang lebih besar dan campuran senyawa tersebut lebih cenderung bersifat non polar. Senyawa steroid lebih cenderung bersifat non-polar sehingga senyawa steroid lebih terdistribusi pada eluen dibandingkan pada plat KLT yang bersifat polar (Ningsih, dkk., 2015). Eluen terbaik dari hasil KLT untuk memisahkan senyawa steroid adalah campuran senyawa n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4,25 : 0,75 (Ningsih, dkk., 2015).

Monitoring menggunakan KLT pada *Eucheuma spinosum* fraksi petroleum eter untuk mengisolasi senyawa steroid dan triterpenoid dengan eluen campuran antara n-heksana : etil asetat perbandingan 4:1; 4,25:0,75; 4,5:0,5. Spot dari eluen campuran dengan komposisi 4,25:0,75 didapatkan 9 spot. Eluen campuran komposisi 4:1 dan 4,5:0,5 didapatkan 8 spot. Berdasarkan jumlah spot yang didapat, eluen dengan komposisi 4,25:0,75 merupakan eluen terbaik. Karena semakin banyak spot yang didapat, semakin baik kemampuan eluen tersebut dalam memisahkan suatu senyawa (Setiyawan, dkk., 2015). KLTA dengan eluen campuran n-heksana:etil asetat pada *Eucheuma spinosum* perbandingan 4:1 ;

4,25:0,75 ; 4,5:0,5 diperoleh hasil untuk campuran eluen n-heksana dan etil asetat perbandingan 4:1 diperoleh 2 spot senyawa steroid yang menunjukkan warna spot biru. Pada perbandingan 4,5:0,5 diperoleh 3 spot senyawa steroid dengan 1 spot berwarna hijau dan 2 spot berwarna biru. Sedangkan perbandingan 4,25:0,75 diperoleh spot yang lebih banyak yaitu 8 spot yang terdiri dari 3 spot steroid dengan warna biru 1 spot warna hijau 1 spot (Sholikah, 2016).

2.5 Uji Antioksidan *Hydrilla Verticillata* dengan Metode DPPH

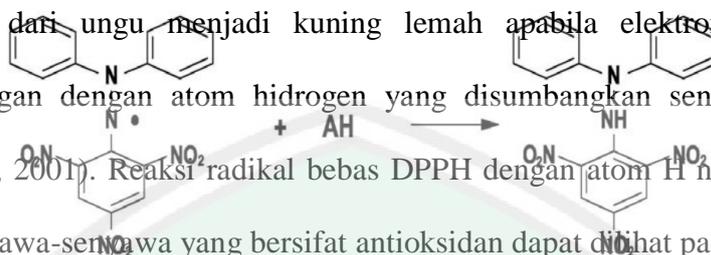
DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam (Molyneux, 2004). DPPH pertama kali ditemukan pada tahun 1992 oleh Goldschmidt dan Renn. Senyawa ini sangat berguna dalam berbagai penyelidikan seperti penentuan antioksidan senyawa fenol atau senyawa alami (vitamin, ekstrak tumbuh-tumbuhan, obat-obatan) serta untuk menghambat reaksi homolitik. DPPH bersifat tidak larut dalam air, berwarna ungu pekat seperti KMnO_4 dan bentuk tereduksinya 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH-H) berwarna jingga kekuningan (Ionita, 2005). Struktur dari DPPH dapat dilihat pada Gambar 2.5:



Gambar 2.5 Struktur DPPH

Metode DPPH adalah sebuah metode sederhana yang dapat digunakan untuk menguji kemampuan antioksidan yang terdapat pada makanan. Metode

DPPH dapat digunakan untuk sampel yang padat dan juga dalam bentuk larutan. Prinsipnya dimana elektron ganjil pada molekul DPPH memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 517 nm yang berwarna ungu. Warna ini akan berubah dari ungu menjadi kuning lemah apabila elektron ganjil tersebut berpasangan dengan atom hidrogen yang disumbangkan senyawa antioksidan (Prakash, 2001). Reaksi radikal bebas DPPH dengan atom H netral yang berasal dari senyawa-senyawa yang bersifat antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2.6:



Gambar 2.6 Reaksi radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan

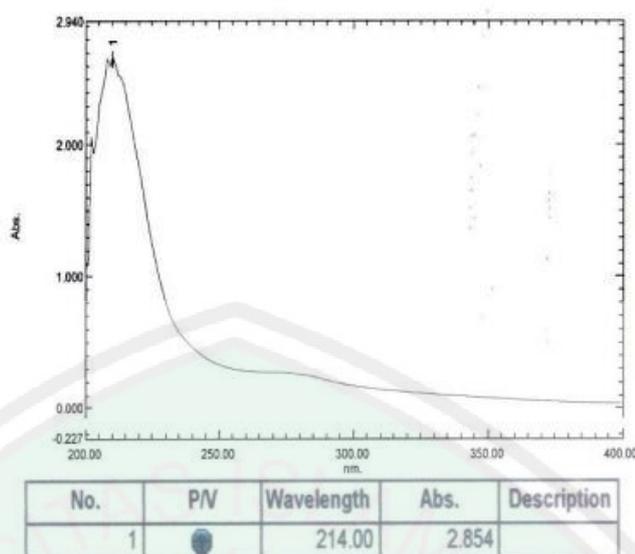
Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau efficient concentration (EC_{50}) atau Inhibitory Concentration (IC_{50}) yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50% yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil nilai EC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkalradikal bebas, dengan kata lain EC_{50} merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menurunkan sebesar 50% dari konsentrasi substrat (radikal DPPH) (Rohman dkk, 2005).

2.6 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu spektroskopi yang sering digunakan dalam analisis kimia. Spektrofotometer ini didasarkan pada interaksi antara materi dan radiasi elektromagnetik. Apabila seberkas radiasi (cahaya)

dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya diserap molekul tersebut. Setiap senyawa dalam sampel memiliki tingkatan energi yang spesifik. Cahaya mempunyai perbedaan energi cahaya sesuai yang diserap dengan panjang gelombang yang diperoleh. Elektron yang terksitasikan melepas energi melalui proses radiasi panas dan akan kembali paada tingkatan dasar lagi. Perbedaan energi antara tingkat dasar dengan tingkat tereksitasi yang spesifik untuk tiap-tiap bahan atau senyawa menyebabkan frekuensi yang diserap juga berbeda-beda (Sastrohamidjojo, 2007). Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400-750 nm (Gandjar dan Rohman, 2007).

Jain dan Bari (2010) melakukan isolasi senyawa turunan steroid dari ekstrak petroleum eter batang kayu *Wrightia tinctoria* yang kemudian dianalisis dengan spektrofotometer UV-vis dan berhasil mengidentifikasi adanya senyawa stigmasterol dengan panjang gelombang 257 nm dan kampesterol dengan panjang gelombang 251 nm. Panjang gelombang 257 nm menunjukkan adanya eksitasi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ yang merupakan kromofor khas untuk suatu sistem ikatan rangkap terkonjugasi ($-C=C-C=C-$) dari suatu cincin aromatik (Jayanti, dkk., 2012). Rahmawati dan Hidajati (2017) melakukan isolasi dan identifikasi dari ekstrak kulit batang tumbuhan mengkudu dan memperoleh hasil yang diduga adalah senyawa digitoksigenin yang merupakan salah satu senyawa steroid pada tumbuhan dengan panjang gelombang 214 nm yang tergambar pada Gambar 2.5. Transisi elektronik pada rentang 200-400 nm adalan $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, dan $\pi \rightarrow \pi^*$ (Pitriyana, dkk., 2017)



Gambar 2.7 Hasil spektra UV-Vis isolat batang mengkudu (Rahmawati dan Hidjati, 2017)

2.7 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan FTIR

Spektroskopi IR biasa digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa. Daerah spektra spektroskopi IR dibagi menjadi 3, yaitu IR dekat (antara 0,8-2,5 μm atau 12.500-4.000 cm^{-1}), IR tengah (antara 2,5-25 μm atau 4.000-400 cm^{-1}), dan IR jauh (antara 25-1.000 μm atau 400-10 cm^{-1}) (Rohman dan Gandjar, 2012).

Absorpsi radiasi IR bersesuaian dengan perubahan energi yang berkisar antara 2-10 kkal/mol. Radiasi pada kisaran energi ini ekuivalen dengan frekuensi vibrasi ulur dan tekuk ikatan dalam kebanyakan ikatan kovalen molekul (Rohman dan Gandjar, 2012). Ketika suatu senyawa berinteraksi dengan radiasi IR, maka akan terjadi vibrasi ikatan-ikatan kovalen pada senyawa tersebut. Hal ini yang kemudian dijadikan dasar untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa. Sebab setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang berbeda sehingga tiap gugus fungsi mempunyai serapan IR yang khas. Identifikasi menggunakan FT-IR hanya akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi

yang terdapat pada struktur steroid. Steroid yang diidentifikasi dengan FT-IR akan memberikan serapan yang khas untuk gugus fungsi OH, C-O alkohol, C=C, dan CH₃. Hasil identifikasi steroid akan dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang telah disebutkan menimbulkan serapan pada daerahnya masing-masing (Mulyani, dkk., 2013).

Identifikasi menggunakan FT-IR hanya akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi yang terdapat pada struktur steroid. Steroid yang diidentifikasi dengan FT-IR akan memberikan serapan yang khas untuk gugus fungsi OH, C-O alkohol dan CH₃. Hasil identifikasi steroid akan dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang telah disebutkan menimbulkan serapan pada daerahnya masing-masing (Mulyani, dkk., 2013).

2.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan menggunakan LC-MS/MS

LC-MS/MS merupakan pemisahan kromatografi cair (HPLC) dengan analisis massa spektrometri. Alat ini memiliki hasil data baik kuantitatif maupun kualitatif diantaranya untuk mengidentifikasi senyawa yang tidak diketahui, menentukan struktur senyawa dengan mengamati fragmentasinya dan menghitung jumlah senyawa dalam sampel. Menurut Michael (2008) LC-MS/MS memiliki beberapa kelebihan dibandingkan alat lain, yaitu :

1. Alat dapat diaplikasikan secara luas tidak terbatas untuk molekul yang bersifat volatil, sangat polar dan persiapan sederhana tanpa derivatisasi.
2. Pengujian berbeda dapat dikembangkan dengan fleksibilitas yang tinggi dengan waktu analisa yang singkat.
3. Hasil analisa sangat khas dan spesifik dari adanya spektrometer massa yang tandem dengan alat.

4. Data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh karena seleksi ion yang cepat dengan banyak parameter.

MS (Spektrometer massa) bekerja dengan mengionkan molekul dan memilih berdasarkan rasio fragmentasi (m/z). Beberapa komponen yang harus terdapat dalam MS yaitu sumber ion dan analisis massa. Komponen tersebut memiliki berbagai jenis yang akan disesuaikan berdasarkan kepolaran senyawa serta kelebihan dan kekurangan masing-masing. Sumber ion yang digunakan pada penelitian yaitu sumber ion jenis Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer (Atmospheric Pressure Chemical Ionization/APCI), menurut pedoman Agilent Tech (2011) metode ini menggunakan eluen yang disemprotkan melalui pemanas bersuhu tinggi (200–400o C) pada tekanan atmosfer. Cairan akan menguap karena adanya uap panas yang timbul dari pemanas. Fase gas pelarut yang dihasilkan akan terionisasi dan ion-ionnya akan mentransfer muatan pada molekul analit. Ion dari analit akan melewati pipa kapiler menuju spektrometer massa. APCI biasanya digunakan pada kromatografi fase normal karena analit yang digunakan merupakan fasa normal.

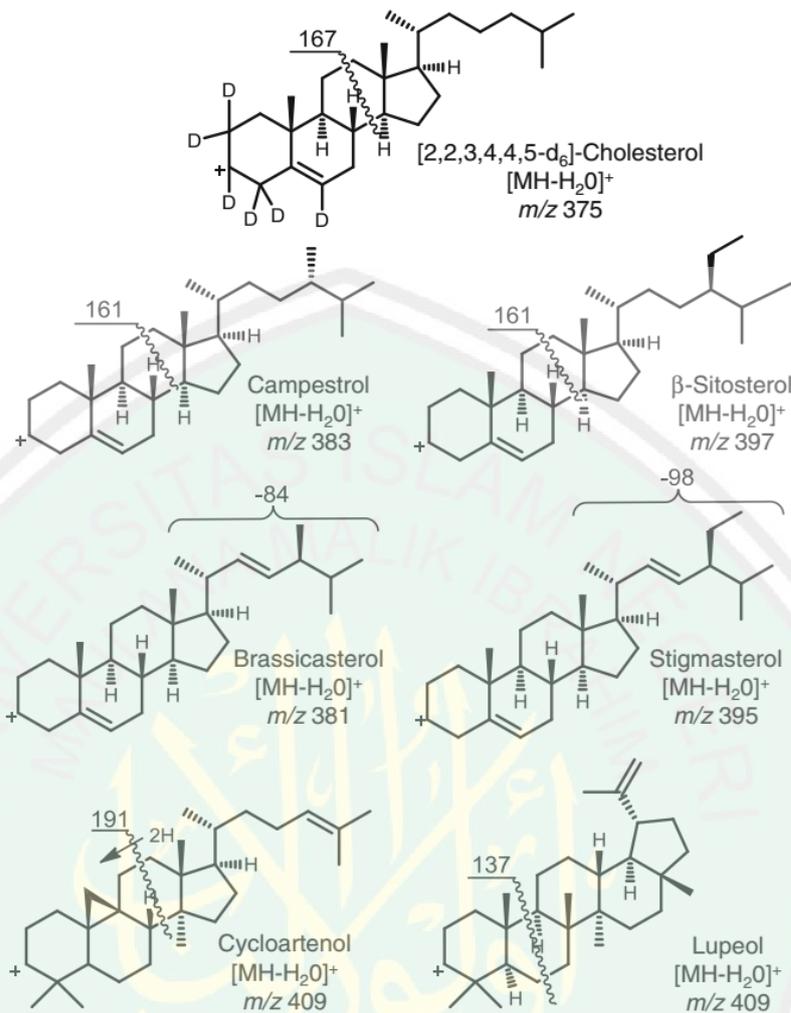
Proses identifikasi steroid menggunakan LC-MS/MS dengan dilengkapi APCI mode positif sebagai sumber ionisasi. Menurut Diaz (2006) APCI dapat menganalisa m/z dengan range 70 – 1000. Sistem LC menggunakan alliance 2695 lengkap dengan autosampler, degasser, dan pemanas kolom. Sistem MS menggunakan ZQ 2000 single quadropole. Sehingga diperoleh data dengan menggunakan software MassLynx 4.0. Kolom yang digunakan adalah C18 150 x 2,1 mm dengan fase gerak asetonitril/air (0,01% asam asetat) dengan laju alir 0,5 mL/menit.

Ion yang dihasilkan kemudian menuju pipa kapiler dan menuju penganalisa masa. LC-MS/MS digunakan untuk menganalisa senyawa yang sangat nonpolar dengan laju alir rendah. Penganalisa masa yang digunakan yaitu analisa massa Quandropole, metode ini terdiri atas empat batang paralel yang diatur dalam persegi yang ditengah persegi dialirkan ion analit. Bidang ini digunakan untuk menentukan rasio massa dari senyawa yang dianalisa dapat melewati bagian filter dengan waktu tertentu. Hasil identifikasi steroid yang telah dilakukan Pereira, dkk. (2016) dengan alga coklat sebagai sampel menggunakan metode APCI menunjukkan 7 puncak senyawa dengan retention time yang berbeda. Puncak yang dihasilkan beberapa diantaranya merupakan senyawa kampesterol dengan m/z 383, β -sitosterol m/z 397, brassikasterol dengan m/z 381, stigmasterol dengan m/z 395, fukosterol dengan m/z 369, kolesterol dengan m/z 369, dan ergosterol dengan m/z 379.

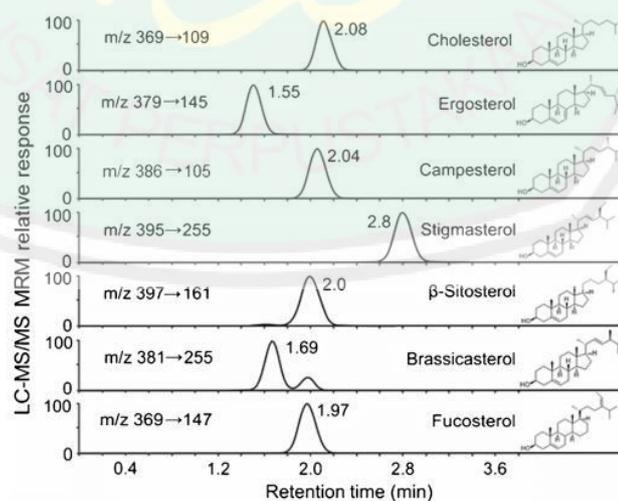
Mo, dkk., (2013) mengidentifikasi adanya enam jenis senyawa dari minyak goreng yang terangkum pada tabel 2.3, menggunakan metode pengamatan ion secara *Selected Reaction Monitoring* (SRM) dengan metode ionisasi *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) mode positif yang tergambar pada Gambar 2.7. Pereira, dkk., (2016) mengidentifikasi adanya tujuh senyawa turunan steroid dari alga coklat yang tergambar pada Gambar 2.8.

Tabel 2.3 Hasil deteksi senyawa (Mo, dkk., 2013)

Jenis Steroid	Waktu Retensi (Menit)	Massa (m/z)	
		Ion Prekursor	Ion Produk
Kolesterol	2	375	161
Brassikasterol	1,9	381	297
Kampesterol	2,3	383	161
Stigmasterol	1,9	395	297
β – sitosterol	2,7	397	161
Sikloartenol	2,1	409	191



Gambar 2.7 Struktur ion prekursor dan ion produk (Mo, dkk., 2013)



Gambar 2.8 Spektra LC-MS/MS/MS Alga coklat (Pereira, dkk., 2016)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Edukasi Organik, Jurusan Kimia, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Januari – April 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas seperti *erlenmeyer* tutup 500 mL, batang pengaduk, gelas arloji, *erlenmeyer* vakum, corong *buchner*, timbangan analitik, spatula, gelas ukur 250 mL, kolom silica gel, corong gelas, *shaker*, *vacuum rotary evaporator*, desikator, gelas ukur 100 mL, pipet tetes, seperangkat KLTP, gunting, pipa kapiler. Instrumentasi yang digunakan yaitu UV-VIS, FTIR merk Varian tipe FT-100 dan LC-MS/MS merk ACCELLA tipe 1250 buatan *Thermo Scientific*.

3.2.2 Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* yang berasal dari Danau Ranu Grati Pasuruan. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah methanol p.a, kloroform 96% p.a, n-heksana 96% p.a, kertas saring, plat KLT GF₂₅₄, dan aluminium foil, larutan DPPH 0,2 mM, etanol, HCl 37 %, natrium bikarbonat, reagen *Lieberman-Burchard* (asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, etanol absolut)

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan berikut:

1. Preparasi sampel
2. Penentuan kadar air secara Termogravimetri
3. Ekstraksi sampel
4. Hidrolisis dan partisi
5. Uji Fitokimia
6. Pemisahan senyawa steroid dengan Kromatografi Kolom
7. Monitoring senyawa steroid menggunakan KLTA
8. Uji antioksidan senyawa steroid menggunakan metode DPPH
9. Identifikasi dengan instrumen UV-Vis, FTIR merk Varian tipe FT-100, dan LC-MS/MS merk ACCELLA tipe 1250 buatan *Thermo Scientific*.
10. Analisa data

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Preparasi Sampel

Pengambilan sampel di Danau Ranu dilakukan di permukaan air dimana jarak antara permukaan dengan dasar air ± 2 m. Sampel diambil sebanyak 10 Kg dan dicuci dengan air. Selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung atau dengan naungan sampai kering. Setelah itu, sampel yang sudah kering dihaluskan dengan ukuran 90 mesh dan dikeringkan pada suhu 38°C selama 24 jam di Materia Medika Kota Batu.

3.4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Cawan porselen disiapkan terlebih dahulu, lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105°C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Selanjutnya

Cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit, lalu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Setelah itu, sebanyak 5 g sampel dimasukkan dalam cawan porselen, kemudian dimasukkan dalam oven dan dikeringkan pada suhu 100-105°C sekitar ±15 menit, lalu sampel disimpan dalam desikator sekitar ± 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ±15 menit, didinginkan dalam desikator sekitar ±10 menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi hingga tercapai berat konstan. Kadar air dalam *Hydrilla verticillata* dihitung menggunakan persamaan (3.1) dan (3.2).

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

Dimana : a = bobot cawan kosong
 b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan
 c = bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots\dots\dots(3.2)$$

Setelah didapatkan nilai dari persamaan 3.1 dan 3.2 maka dihitung nilai kadar air terkoreksi. Kadar air terkoreksi dihitung dengan cara nilai kadar air dikurangi dengan faktor koreksi.

3.4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi. Sampel *hydrilla* yang telah dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 100 g dan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol 96% dengan perbandingan 1:5 (b/v) dan dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minutes*). Proses ekstraksi maserasi dilakukan penggantian pelarut setiap 24 jam sekali, pengulangan pelarut

sebanyak 4 kali. Pengambilan filtrat dilakukan penyaringan menggunakan corong *bunchner*. Total filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu. Filtrat yang didapat dipekatkan dengan rotary evaporator. Ekstrak pekat ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan persamaan 3.3.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.3)$$

3.4.4 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan cara penambahan HCl 2 N perbandingan 1:2 (b/v). Proses hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan magnetik stirer hot plate pada suhu ruang. Selanjutnya dinetralkan pH-nya dengan menambahkan natrium bikarbonat (NaHCO₃). Ekstrak pekat metanol hasil hidrolisis *Hydrilla verticillata* yang diperoleh dipartisi dengan pelarut n-heksana. Pelarut n-heksana ditambahkan sebanyak 25 mL kemudian dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Dilakukan partisi kembali sampai 3 kali pengulangan dengan pelarut n-heksana. Proses partisi dilakukan hingga diperoleh fasa air bening. Lapisan organik dimasukkan kedalam labu alas bulat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* lalu dialiri dengan gas N₂. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya ditimbang dan dihitung rendemennya (Imamah, dkk., 2005).

3.4.5 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan dengan melarutkan fraksi dari pelarut n-heksana ke dalam 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1 – 2 mL asam sulfat

pekat (melalui dinding tabung), jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawa steroid.

3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom

Frakasi n-heksana dari *Hydrilla v.* menunjukkan positif steroid kemudian, dilakukan pemisahan senyawa steroid dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom dilakukan menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ sebanyak 10 g, diaktivasi dengan pemanasan dalam oven selama 2 jam pada suhu 110 °C, selanjutnya didinginkan dengan meletakkannya dalam desikator selama 15 menit. Pembuatan bubuk dilakukan dengan cara silika gel yang telah diaktivasi dicampur dalam 20 mL pelarut n-heksana : etil asetat (95:5) hingga homogen selama ± 1 jam. Bubur silika gel dimasukkan dalam kolom yang mula-mula telah terisi glasswool pada bagian bawah. Selama penambahan silika, dinding kolom diketuk-ketuk sampai adsorben yang dihasilkan benar-benar mampat dan dipastikan tidak ada gelembung udara, kemudian didiamkan selama 24 jam (Kusmiyati, dkk., 2011).

Frakasi hasil partisi fraksi n-heksana sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 1 mL eluen n-heksana : etil asetat (95:5) dan di pipet ke dalam kolom. Setelah sampel turun ditambah gradien eluen n-heksana : etil asetat secara berurutan 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 dan 70:30 ml. kran dibuka dengan kecepatan alir diatur 2 mL/menit dan dilakukan elusi kemudian eluat ditampung setiap 2 mL dalam botol vial hingga didapatkan kurang lebih 270 vial. Proses elusi dilakukan dengan menjaga agar silika gel dalam kolom selalu terendam eluen.

3.4.7 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLTA

Hasil kromatografi kolom di monitoring senyawa steroidnya menggunakan KLTA. Plat silika G₆₀ F₂₅₄ yang berukuran 10x10 cm diaktivasi dengan pemanasan dalam oven pada suhu 110 °C selama 30 menit. Penotolan dilakukan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 5 kali totalan yang diselingi dengan pengeringan yang kemudian dielusi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (17:3) (Baderos, 2017). Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat hasil pemisahan dideteksi dengan menyemprotkan LB, kemudian diamati secara langsung dan dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Desianti, dkk.,2014), kemudian dianalisis terbentuknya warna hijau kebiruan manunjukkan adanya steroid (Indrayani, dkk., 2006). Eluat yang mempunyai harga R_f yang sama dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid digabungkan (Utama, dkk., 2013).

3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

3.4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95% dipipet sebanyak 4,5 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL, dimasukkan kedalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari λ_{\max} DPPH dan dicatat hasil pengukuran λ_{\max} untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, dkk. 2005).

3.4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Masing-masing isolat dilarutkan dalam pelaut etanol 95% dengan konsentrasi 50 ppm dan diuji aktivitas antioksidanya menggunakan

spektrofotometer UV-Vis pada λ_{\max} yang telah didapatkan. Selanjutnya hasil uji aktivitas antioksidan yang terbaik divariasikan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Isolat masing-masing konsentrasi dipipet 3 mL dan ditambahkan 1 mL DPPH 0,2 mM kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 90 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{\max} yang telah didapatkan. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Arindah, dkk. 2010):

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left(\frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi DPPH sisa}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \% \dots\dots (3.4)$$

Selanjutnya dihitung nilai EC_{50} nya dengan memperoleh persamaan regresi menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doresponse data*”. Nilai EC_{50} juga dihitung dalam persamaan $y = ax + b$ yang diperoleh dari kurva regresi linier dari hubungan persen aktivitas antioksidan dan konsentrasi ekstrak antioksidan. EC_{50} dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% kedalam persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi EC_{50} . Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM dalam etanol 95%.

3.4.9 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil Isolat steroid dengan aktivitas toksisitas paling tinggi diidentifikasi menggunakan UV-Vis. Pelarut dan Isolat steroid yang telah dilarutkan dalam pelarutnya dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm.

3.4.10 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Hasil isolat steroid n-heksana menunjukkan nilai aktivitas antioksidan terbaik diidentifikasi menggunakan FTIR. Isolat tersebut dicampur dengan pelet KBr dengan perbandingan 2:98 lalu digerus bersamaan dengan mortar agate. Campuran pelet KBr dan sampel yang telah halus dipres dengan tekanan 80 torr (8-20 torr per satuan waktu) selama 10 menit. Selanjutnya pelet yang telah di press dianalisis menggunakan FTIR.

3.4.11 Identifikasi menggunakan Instrumen LC-MS/MS

Isolat senyawa steroid yang memiliki sifat paling toksik dianalisis menggunakan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2.1 mm x 1.9 μ m). UHPLC merk ACCELLA *type* 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler*. *Thermostatic* yang dikendalikan oleh computer melalui program x-calibur 2.1. fasa gerak yang digunakan adalah 0.1% asam format dalam air (fase A) dan 0.1% asam format dalam asetonitril (fase B). pengaturan eluen secara gradient linier 100% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 100% (B) yang diatur selama 5 menit dengan laju alir 500 μ L/menit. Volume yang diinjeksikan 2 μ L. kolom dikontrol pada suhu 30°C, dan kompartemen auto sampler ditetapkan untuk 10°C. MS yang digunakan adalah MS/MS *triple Q (Quadrupole)* spectrometer masa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh *software* TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif. Kondisi ion APCI 41 adalah sebagai berikut: arus yang digunakan 4 μ A, suhu penguapan 250°C, suhu kapiler

300°C, *sheat gas pressure* 45 arbitrary units, dan Aux as pressure 15 arbitrary units.

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa grafik dan angka yang kemudian dideskripsikan hasilnya. Hasil aktivitas antioksidan berupa data angka yang dinyatakan dalam EC₅₀. Identifikasi senyawa steroid dapat diketahui dengan melakukan analisis hasil uji Kromatografi Kolom Data yang diperoleh merupakan fraksi-fraksi hasil partisi dimonitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄. Eluat yang mempunyai harga R_f sama dikumpulkan menjadi satu. Hasil identifikasi juga diperoleh dari spektrofotometer UV-Vis, FT-IR, dan LC-MS/MS berupa spektra yang kemudian dibandingkan menggunakan literatur.

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel *Hydrilla verticillata*

Hydrilla sebagai sampel pada penelitian ini diperoleh dari danau Ranu Grati, Kabupaten Pasuruan. Preparasi pada sampel *Hydrilla* meliputi pencucian untuk membersihkan sampel dari kotoran yang menempel, kemudian dikeringkan untuk mengurangi kandungan air di dalam sampel, menghentikan reaksi enzimatik dan meminimalisir tumbuhnya jamur (Manoi, 2015). Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara kering angin yaitu pengeringan tanpa menggunakan sinar matahari secara langsung, hal ini dikarenakan agar senyawa aktif yang diinginkan tidak mengalami kerusakan akibat suhu tinggi.

Proses terakhir adalah penghalusan dan pengayakan dengan ukuran ayakan ± 90 mesh, proses ini untuk memperluas permukaan sampel sehingga mempermudah pada tahap ekstraksi. Menurut Voight (1995) Semakin kecil bentuk sampel maka luas permukaannya akan semakin besar sehingga kontak yang terjadi antara sampel dengan pelarut akan semakin besar dan pelarut dapat mempercepat rusaknya dinding sel untuk mempermudah pengambilan kandungan senyawa di dalamnya. Sampel kering *Hydrilla* yang telah di haluskan dan di ayak berukuran ± 90 mesh menghasilkan sebanyak 950 gram serbuk *Hydrilla* kering dari 10 Kg sampel *Hydrilla* basah.

4.2 Penentuan Kadar Air Secara Termogravimetri

Penentuan kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan air dalam sampel kering *Hydrilla verticillata*. Kandungan air yang rendah pada sampel akan

mempermudah proses penarikan zat aktif dalam sampel karena pelarut mudah menembus dinding sel sampel tanpa adanya gangguan dari molekul air (Khoiriyah, dkk, 2014). Metode untuk penentuan kadar air adalah termogravimetri, yaitu metode penghilangan sebagian air dari sampel menggunakan panas pada suhu 100-105°C sampai di peroleh berat konstan (Jung dan Wells, 1997).

Hasil penentuan kadar air didapatkan sebesar 6,53 %, nilai tersebut sesuai dengan peraturan Depkes RI (1994) bahwa kadar air dalam sediaan obat tradisional termasuk ekstrak tidak melebihi batas 10%. Berdasarkan hasil tersebut kadar air dalam sampel kering tidak melebihi batas maksimum kadar air yang ditentukan agar tidak mengganggu proses ekstraksi. Pada penelitian Ikfi (2017) didapatkan hasil kadar air *Hydrilla* kering sebesar 8,218 %.

4.3 Ekstraksi Sampel dengan Pelarut Metanol

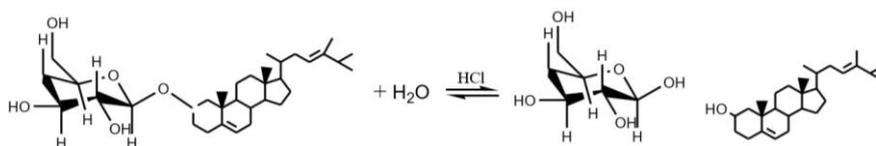
Ekstraksi padat cair atau ekstraksi maserasi merupakan langkah awal untuk mengisolasi senyawa steroid dari sampel *Hydrilla verticillata*. Proses ekstraksi akan memecah dinding sel karena adanya perbedaan tekanan dari dalam dan luar sel sehingga menyebabkan metabolit sekunder dalam sampel akan terbawa keluar bersama pelarut yang digunakan. Senyawa steroid pada tanaman memiliki sifat polar karena dalam bentuk ikatan glikosida, penelitian ini menggunakan pelarut metanol p.a yang bersifat polar agar senyawa steroid yang bersifat polar di dalam *Hydrilla* dapat terekstrak sesuai dengan sifat polar dari metanol. Proses ekstraksi maserasi dihentikan ketika warna filtrat dari sampel sudah berubah menjadi lebih bening, pada penelitian ini digunakan empat kali ulangan ekstraksi. Filtrat hasil maserasi dengan metanol yang didapatkan dijadikan satu dan diuapkan

menggunakan *rotary evaporator* agar diperoleh ekstrak kasar metanol. Hasil randemen yang dihasilkan pada penelitian ini dari 100 g, yaitu sebesar 5,06 %.

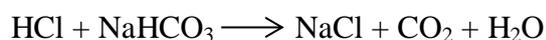
4.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Senyawa metabolit sekunder atau senyawa steroid pada tanaman umumnya terdapat dalam bentuk ikatan glikosida yaitu gabungan dari dua senyawa antara steroid dan gula sehingga dilakukan proses hidrolisis. Proses hidrolisis secara asam akan memutuskan ikatan glikosida menjadi glikon (gula) dan aglikon (bukan gula). Hidrolisis senyawa steroid ekstrak kasar metanol sebanyak 10 gram dilakukan dengan menggunakan asam HCl. Pemilihan HCl yang tergolong asam kuat ini lebih mudah melepaskan proton H^+ secara sempurna dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ (Handoko, 2006).

Sifat reaksi hidrolisis adalah *reversible* atau bolak balik, oleh karena itu dilakukan penetralan agar tidak terjadi reaksi pembentukan ikatan glikosida antara glikon dan aglikon kembali. Penetralan dilakukan dengan larutan basa lemah natrium bikarbonat untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung yaitu gas CO_2 yang mengidentifikasi bahwa HCl dan $NaHCO_3$ sudah bereaksi. Reaksi yang terjadi pada proses hidrolisis dan penetralan dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan 4.2



Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Ikatan O-glikosida (Khasanah, 2018)



Gambar 4.2 Reaksi Penetralan

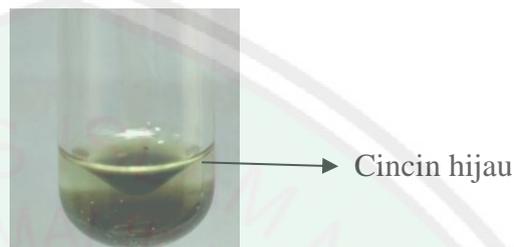
4.5 Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Hasil hidrolisis (hidrosilat) yang diperoleh kemudian dipartisi untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder atau senyawa steroid yang telah terlepas ikatannya dari gugus gula, berdasarkan distribusi komponen target pada dua pelarut yang tidak saling bercampur. Partisi senyawa metabolit sekunder ekstrak metanol *Hydrilla* menggunakan pelarut n-heksana. n-Heksana merupakan pelarut organik non polar, sehingga dapat menarik senyawa steroid yang bersifat non polar. Proses partisi menghasilkan dua fasa cairan yaitu fasa air (senyawa polar) pada bagian bawah dan fasa organik (senyawa nonpolar) pada bagian atas, hal ini dikarenakan perbedaan berat jenis n-heksana (0,655 g/mL) lebih kecil dibandingkan berat jenis air (1 g/mL). Partisi dilakukan sebanyak tiga kali sampai terjadi perubahan warna menjadi lebih pucat untuk diambil fasa organik yang mengandung senyawa steroid. Dari 10 gram ekstrak kasar yang di hidrolisis, didapatkan fraksi pekat n-heksana sebesar 4,7 gram dengan randemen 47,95% (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4).

4.6 Uji Fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui adanya steroid pada hasil fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. Metode yang digunakan yaitu menggunakan pereaksi *Lieberman Burchard*. Pada penelitian Hanapi (2013) *Lieberman Burchard* merupakan reagen yang spesifik untuk uji steroid dengan komposisi kloroform, asam asetat anhidrida dan asam sulfat pekat. Penambahan reagen *Lieberman Burchard* pada fraksi yang mengandung senyawa steroid akan menunjukkan perubahan warna menjadi hijau sampai biru (Auterhoof dan Kovar, 1987). Perubahan warna yang terjadi karena adanya reaksi oksidasi golongan senyawa

steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Robertino, dkk., 2015). Hasil dari uji fitokimia pada fraksi n-Heksana ini dihasilkan warna hijau yang menunjukkan positif mengandung senyawa steroid. Hasil uji fitokimia pada *Hydrilla verticillata* fraksi n-heksana dan Ekstrak kasar ditunjukkan pada Gambar 4.3



Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia pada fraksi n-heksana

Berdasarkan Gambar 4.4 menunjukkan terdapat golongan senyawa aktif steroid yang ditandai dengan warna hijau. Astuti, dkk., (2014) menyatakan bahwa uji kualitatif senyawa steroid menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard* menghasilkan warna hijau. Hafiz (2017) dan Hasanah (2017), juga menyatakan bahwa ekstrak kasar n-heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* positif mengandung steroid.

4.7 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Kolom

Pemisahan senyawa steroid yang terdapat pada fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata* menggunakan kromatografi kolom. Prinsip pemisahan kromatografi kolom berdasarkan adsorpsi senyawa pada dua fase yang berbeda yaitu fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam pada pemisahan ini adalah silika gel, dikarenakan ukurannya yang kecil sehingga mampu memberikan luas permukaan yang besar untuk bisa berinteraksi lebih kuat dengan senyawa polar. Fasa geraknya adalah campuran dari n-Heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; dan 70:30 mL yang dilakukan dengan metode variasi gradien eluen.

Penggunaan variasi gradien eluen bertujuan untuk memperoleh senyawa yang terisolasi sesuai dengan kepolaran variasi gradien eluennya.

Langkah pertama pada kromatografi kolom yaitu aktivasi silika gel, menurut Noviyanti (2010) tujuan aktivasi silika gel untuk mengaktifkan gugus hidroksil (-OH) sehingga gugus hidroksil pada silika gel menjadi aktif dan dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa yang dipisahkan, selain itu untuk menguapkan air yang terdapat pada silika gel. Silika gel yang telah teraktivasi kemudian dibuburkan dengan eluen n-heksana : etil asetat untuk mempercepat proses homogenasi dan membuat silika gel dalam kolom menjadi rapat, sehingga tidak terdapat celah udara yang menghambat proses pemisahan.

Perbandingan antara sampel dan fase diam yang digunakan adalah 1:150 (Tyas, 2017). Proses isolasi menggunakan sistem gradien eluen, eluen dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan mulai dari perbandingan 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; dan 70:30 mL secara berurutan dan terus-menerus. Variasi eluen yang cenderung bersifat non polar dikarenakan sifat dari senyawa steroid yang non polar. Pada proses elusi, senyawa yang bersifat non polar akan ikut bersama dengan laju eluen sedangkan senyawa yang bersifat polar akan cenderung tertahan pada fase diamnya. Penampungan eluat dilakukan setiap 2mL/menit agar meminimalkan bercampurnya kembali senyawa yang telah terpisah dari kolom, pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom ini dihasilkan 276 vial.

4.8 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLT

Monitoring dengan KLT Analitik pada eluat hasil kromatografi kolom bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan senyawa yang telah terpisah pada pemisahan kromatografi kolom. Teknik pemisahan pada KLT

berdasarkan distribusi fase diam berupa lapisan tipis silika gel F₂₅₄ yang terdapat pada plat KLT san fasa gerak berupa campuran pamarut n-heksana : etil asetat (17:3) (Mardaneni, 2017).

Pengelompokkan senyawa dilakukan berdasarkan warna noda yang terbentuk dan Rf. Penggabungan antar vial menjadi gabungan fraksi yang lebih besar dilakukan apabila warna noda yang terbentuk sama dengan nilai Rf. Eluat dimonitoring seagian pada *range* per 2 vial yaitu 2, 4, 6, 8, 10, 12 hingga 276 dengan cara menotolkan eluat ke plat KLT dan dielusi dengan eluen (17:3). Pengamatan noda dilakukan dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm. Hasil monitoring dari kromatografi kolom dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil monitoring kromatografi kolom dengan KLTA

No	Vial	Warna UV (254/366 cm ⁻¹)	Rf	Senyawa	Berat Isolat (mg)	Randemen (%)
1	11-20	Hitam	0,80	Steroid	20,4	0,30
2	44-52	Merah	0,52	Triterpenoid	0,6	0,008
3	53-67	Merah	0,52	Triterpenoid	0,4	0,005
4	68-77	Merah	0,43	Triterpenoid	1	0,014
5	96-112	Merah	0,2	Triterpenoid	2,2	0,032
6	113-137	Merah	0,2	Triterpenoid	1,8	0,026
7	138-158	Merah	0,12	Triterpenoid	2	0,029
8	159-193	Merah	0,12	Triterpenoid	2	0,029
9	194-214	Merah	0,07	Triterpenoid	1,1	0,016
		Merah	0,07	Triterpenoid		
		Merah	0,37	Triterpenoid		
10	215-233	Merah	0,12	Triterpenoid	1,6	0,023
11	234-276	Merah	0,03	Triterpenoid	1,6	0,023

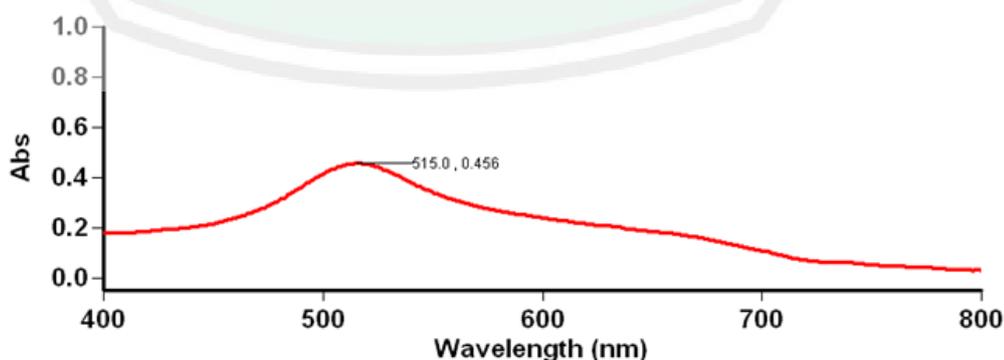
Hasil monitoring dari tiap-tiap vial didapatkan 11 kelompok fraksi besar dengan satu noda tunggal berwarna hitam saat pengamatan noda dengan lampu

UV 254 nm menunjukkan senyawa tersebut adalah steroid, dengan Rf 0,8. Pada penelitian Yuda (2017) didapatkan steroid hasil KLT ekstrak tanaman patikan kebo (*Euphorbia hirta L.*) berwarna hitam di bawah lampu UV 254 nm dengan Rf 0,80. Isolat hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom yang menunjukkan senyawa steroid selanjutnya diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

4.9 Uji Antioksidan Terhadap DPPH

4.9.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum digunakan sebagai acuan panjang gelombang ketika pengukuran aktivitas antioksidan. Penggunaan panjang gelombang maksimum pada saat pengukuran bertujuan untuk mendapatkan hasil absorbansi yang akurat. Hal ini disebabkan karena pengukuran absorbansi sampel yang dilakukan pada panjang gelombang maksimum memiliki kepekaan yang tinggi (Rohman, 2007). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum terhadap larutan DPPH 0,2 mM adalah 515 nm. Hasil ini sesuai literatur dari Parkash, dkk., (2001) yang menyebutkan bahwa absorbansi maksimum DPPH pada panjang gelombang 515-520 nm. Hasil pengukuran UV-Vis dari pengukuran yang telah dilakukan dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH

4.9.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Isolat Steroid

Pengukuran potensi antioksidan pada isolat senyawa steroid hasil kromatografi kolom dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dilakukan secara kuantitatif. Masing-masing konsentrasi direaksikan dengan larutan DPPH 0,2 mM dengan waktu inkubasi 30 menit. Proses inkubasi 30 menit akan merubah warna ungu dari radikal DPPH menjadi memudar, perubahan warna ini terjadi akibat adanya elektron radikal bebas DPPH yang berpasangan dengan atom H dari senyawa antioksidan pada steroid. DPPH berubah menjadi bentuk tereduksinya yaitu *1,1-difenil-2-picrylhydrazine* (DPPH-H) (Ionita, 2003). Semakin kuat potensi antioksidan, maka radikal DPPH akan semakin banyak yang terstabilkan oleh atom H dari senyawa antioksidan (Kuncahyo, 2007).

Kekuatan potensi antioksidan dari masing masing konsentrasi diketahui dari absorbansi yang di dapat. Nilai absorbansi inilah yang digunakan untuk menghitung persen (%) aktivitas antioksidan. Persen (%) aktivitas antioksidan ini merupakan parameter kemampuan antioksidan pada masing-masing konsentrasi yang berbeda pada isolat steroid *Hydrilla verticillata*. Hasil perhitungan nilai persen (%) aktivitas antioksidan pada sampel isolat steroid *Hydrilla* dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Nilai persen (%) aktivitas antioksidan

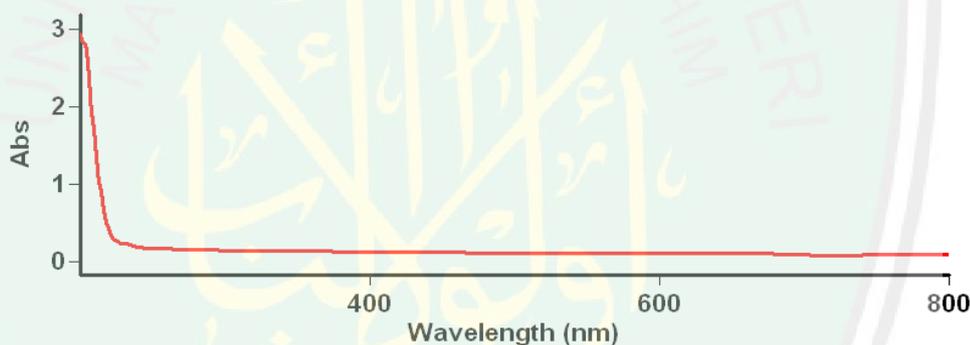
Konsentrasi (ppm)	Persen (%) aktivitas antioksidan
1 ppm	0,79 %
2 ppm	1,2643 %
3 ppm	3,1602 %
4 ppm	5,1045 %
5 ppm	7,0159 %
EC₅₀ = 24,48 ppm	

Hasil perhitungan persen (%) aktivitas antioksidan pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa isolat steroid *Hydrilla* mempunyai aktivitas antioksidan.

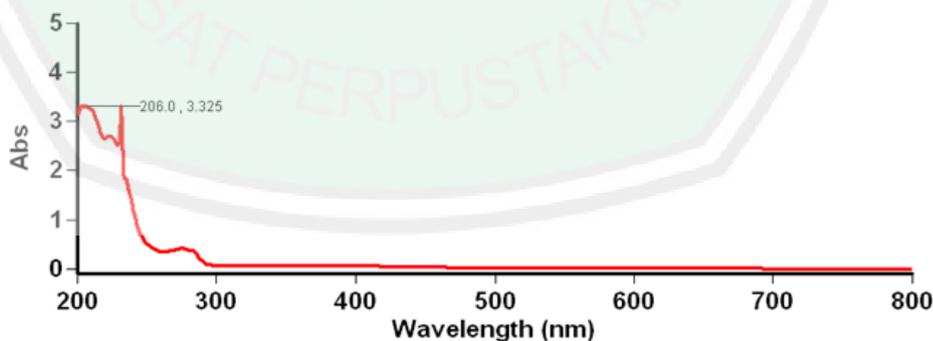
Nilai persen (%) antioksidan mengalami kenaikan seiring dengan kenaikan konsentrasi yang digunakan. Nilai tertinggi dari isolat steroid adalah pada konsentrasi 5 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak konsentrasi yang digunakan, maka semakin banyak radikal DPPH yang terstabilkan oleh senyawa antioksidan yang terdapat pada sampel. Data yang telah didapat dari perhitungan nilai persen (%) aktivitas antioksidan digunakan untuk menghitung EC_{50} yang merupakan parameter utama pada pengukuran aktivitas antioksidan. Hasil EC_{50} dari semua isolat steroid *Hydrilla* didapatkan sebesar 24,48 ppm.

4.10 Identifikasi Senyawa Steroid

4.10.1 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



Gambar 4.5 Hasil spektra UV-Vis n-Heksana



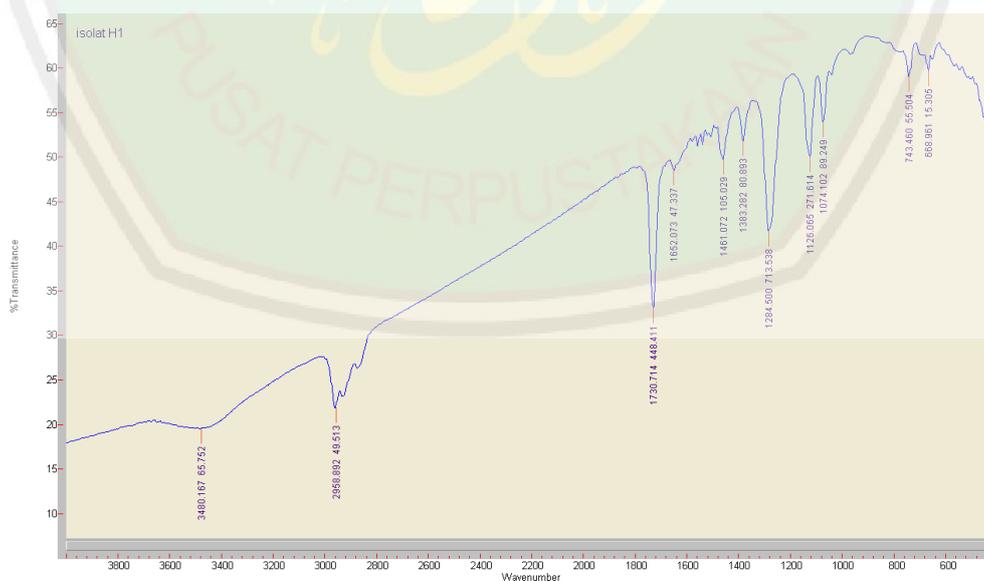
Gambar 4.6 Hasil spectra UV-Vis isolat steroid

Berdasarkan gambar 4.5 hasil spektra UV-Vis n-heksana tidak didapatkan serapan maksimum, sehingga tidak berpengaruh pada serapan maksimum isolat

steroid *hydrilla*. Gambar 4.6 isolat steroid menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 206, nm. Panjang gelombang 206 nm tersebut menunjukkan adanya senyawa steroid dan terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi dengan transisi π - π^* . Hal ini sesuai dengan penelitian Amalyah dan Hidajati (2015) dengan melakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder pada kulit batang tumbuhan nyiri batu terdapat adanya serapan maksimum pada 206,80 nm yang menunjukkan adanya senyawa steroid.

4.10.2 Identifikasi menggunakan FTIR

Salah satu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa menggunakan FTIR. Dalam FTIR terjadi interaksi antara energi dengan molekul yang menyebabkan terjadinya transisi akibat adanya vibrasi molekul, sehingga setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang berbeda sehingga tiap gugus fungsi mempunyai serapan IR yang khas. Spektra FTIR dari hasil isolat *Hydrilla verticillata* dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Hasil identifikasi isolat steroid menggunakan FTIR

Tabel 4.3 Interpretasi FTIR Isolat Steroid

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range Pustaka (cm ⁻¹) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas (Socrates, 1994)
1.	3480,167	3550 – 3250	rentangan OH	m – s
2.	2958,892	3000 – 2800	rentangan C sp ₃ -H	m – s
3.	1730,314	1780 – 1730	C=O	M
4.	1652,073	1690 – 1620	rentangan C=C	M
5.	1451,072	1470 – 1460	C-H ₂	W
6.	1383,282	1395 – 1365	rentangan -C(CH ₃) ₂	M
7.	1284,500	1300 – 1200	Alkohol sekunder	W
8.	1126,065	1100 – 1300	C-O-C	S
9.	1074,102	1125 – 1000	C-O alkohol Sekunder	s – w
10.	743,460	995 – 650	Vibrasi C-H goyangan	W
11.	668,961	995 – 650	=C-H siklik (luas)	W

Keterangan : s = *strong*, m = *medium*, w = *weak*

Gambar 4.7 merupakan serapan FTIR isolat steroid hasil kromatografi kolom, adanya pita serapan pada daerah 3480,167 cm⁻¹ yang melebar mengindikasikan gugus hidroksi (OH). Data ini diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1074,102 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya vibrasi C-O alkohol. Sedangkan pita serapan pada bilangan gelombang 2958,892 cm⁻¹ diduga merupakan rentangan -CH alifatik yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai gugus metil (CH₃) (Socrates, 1994). Dugaan ini diperkuat dengan adanya vibrasi tekukan C-H pada pita serapan 1451,072 cm⁻¹ dan 1383,282 cm⁻¹. Adanya vibrasi C-H tekukan pada spektra mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang merupakan serapan khas pada senyawa steroid (Astuti, dkk., 2014).

Vibrasi pada bilangan gelombang 1730,314 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus C=O dan vibrasi pada bilangan gelombang 1652,073 cm⁻¹ menunjukkan

adanya C=C non konjugasi. Berdasarkan tabel 4.3 maka isolat tersebut diduga mengandung senyawa steroid yang memiliki gugus C-H alkil, rentangan C=O, vibrasi tekukan C-H, rentangan OH, C=C dan vibrasi C-O karbonil (Astuti, 2014).

4.10.3 Identifikasi menggunakan Instrumen LC-MS/MS

Identifikasi menggunakan instrumen LC-MS/MS dilakukan pada isolat steroid fraksi n-heksana *Hydrilla* yang tergambar pada Gambar 4.8. LC-MS/MS merupakan instrumen yang berfungsi untuk memisahkan senyawa berdasarkan berat dan struktur molekul, serta distribusi kepolarannya terhadap fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Looi, dkk. (2013) menyatakan bahwa LC-MS/MS adalah teknik yang banyak digunakan untuk berbagai aplikasi yang memiliki sensitivitas dan spesifikasi sangat tinggi. LC-MS/MS yang digunakan pada penelitian ini yaitu UHPLC-MS/MS dengan tingkat sensitivitas yang tinggi, hal ini dikarenakan HPLC yang digunakan menggunakan tenaga ultra dengan detektor ganda yaitu MS/MS. Sehingga akan menghasilkan beberapa m/z diantaranya yaitu massa induk (*parent mass*) dan massa anak (*daughter mass*) atau massa ion hasil pecahan dari masa induk. Hasil identifikasi LC-MS/MS merupakan data berbentuk kromatogram yang menunjukkan puncak dan waktu retensi (R_t) serta data nilai m/z . Berdasarkan kromatogram yang diperoleh, hasil pemisahan steroid dari isolat steroid fraksi n-heksana dilihat pada Gambar 4.8.

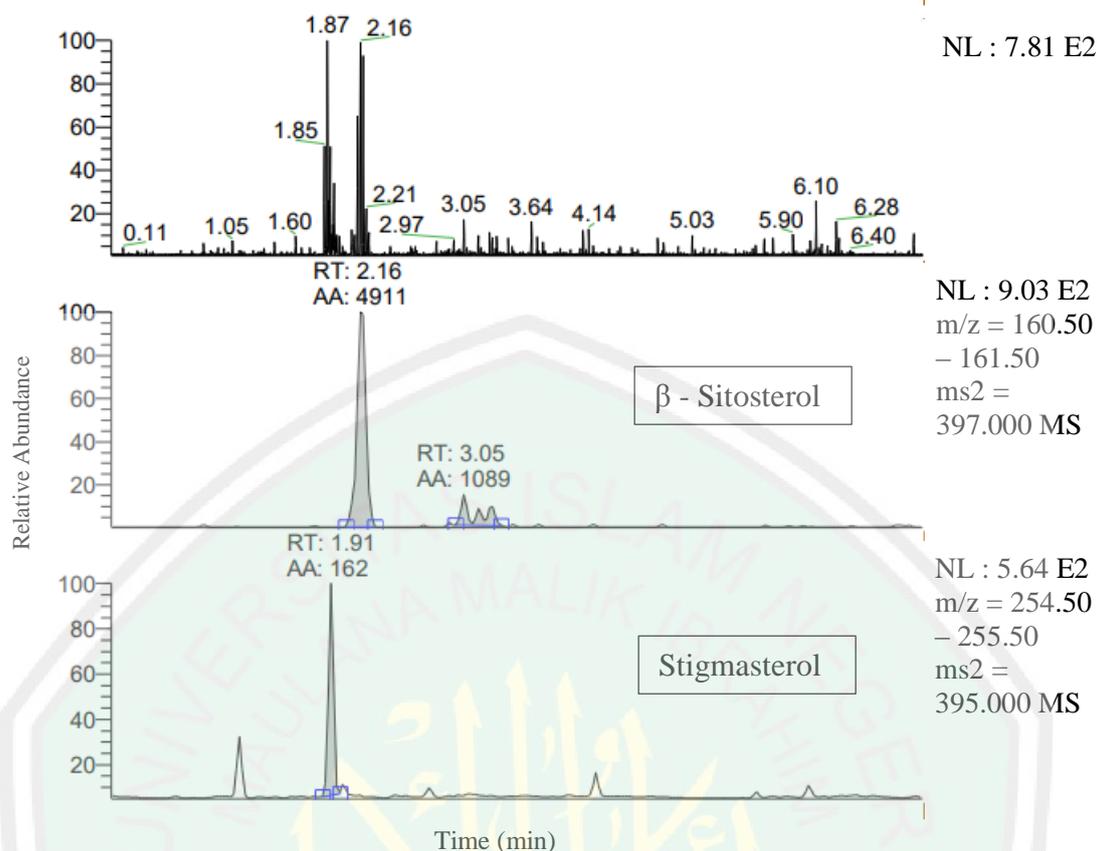
Menurut Khalaf, dkk. (2011) senyawa steroid tersebut berada pada kondisi ionisasi sehingga semua senyawa kehilangan satu molekul air dan ion yang terdeteksi oleh spektrometer selalu berbentuk $[M-H_2O+H]^+$ untuk massa induk (*parent mass*) yang biasa disebut ion prekursor, sedangkan massa anak (*daughter mass*) yang biasa disebut ion produk akan terdeteksi sebagian dari massa induk

dan merupakan hasil fragmentasi dari ion prekursor dengan nilai m/z nya lebih kecil, dan hanya terdeteksi sebagian dari massa ion prekusornya (Khalaf, dkk., 2011). Berikut hasil ion-ion steroid yang terdeteksi dengan LC-MS/MS disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil deteksi ion steroid oleh LC-MS/MS

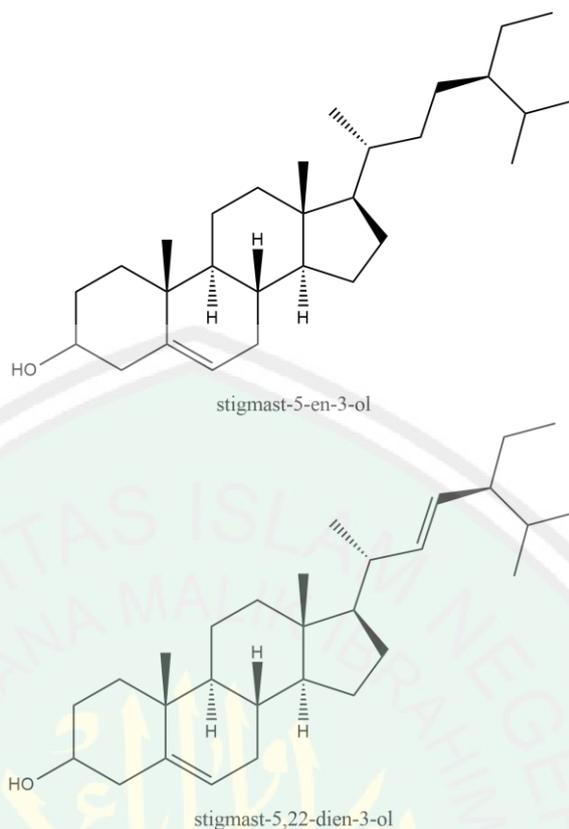
Jenis Steroid	Waktu Retensi (menit)	Massa (m/z)			
		M	Ion prekursor	Ion produk	Kelimpahan
β -Sitosterol	2,16	414	397	160,5-161,5	4911
Stigmasterol	1,91	412	395	254,4-255,5	162

Tabel 4.4 menunjukkan kelimpahan, kepolaran, dan berat molekul senyawa pada isolat steroid fraksi n-heksana *Hydrilla*. Senyawa dengan kelimpahan terbesar adalah senyawa β -Sitosterol. Nilai kelimpahan diperoleh dari nilai luas areanya atau *Automatic Area* (AA) dengan nilai sebesar 4911. Kepolaran dari suatu senyawa dapat dilihat dari waktu retensinya, semakin tinggi waktu retensi maka senyawa semakin non polar dan sebaliknya. Senyawa β -Sitosterol mempunyai waktu retensi yang lebih besar dari senyawa stigmasterol. Berat molekul senyawa β -Sitosterol sebesar 397 m/z dan stigmasterol 395 m/z . Hasil tersebut juga memiliki kemiripan dengan penelitian yang dilakukan Mardaneni (2017), yang telah berhasil mengidentifikasi lima senyawa golongan steroid yang beberapa diantaranya β -Sitosterol dan stigmasterol dari isolat steroid fraksi etil asetat alga merah dengan nilai m/z masing-masing sebesar 397 dan 395. Struktur ion prekursor dan ion produk hasil LC-MS/MS tergambar pada Gambar 4.7.



Gambar 4.8 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid *Hydrilla verticillata*

Gambar 4.8 hasil kromatogram isolat steroid fraksi n-heksana menghasilkan dua spektra senyawa. Puncak senyawa β -Sitosterol menunjukkan bentuk puncak tunggal, tinggi sengan ukuran yang lebih besar dari pada puncak-puncak senyawa lain. Puncak senyawa stigmasterol menghasilkan puncak lebih kecil daari puncak senyawa β -Sitosterol, berjumlah dua puncak yang berbentuk lurus dengan dugaan sebagai isomernya. Sedangkan, puncak-puncak lain yang ada disebelah puncak senyawa adalah *noise*.



Gambar 4.9 Struktur ion prekursor dan ion produk

4.11 Pemanfaatan *Hydrilla* dalam Prespektif Islam

Salah satu jenis tumbuhan yang diciptakan oleh Allah *Subhanahu wa ta'ala* di bumi yaitu *Hydrilla*. Tumbuhan *Hydrilla* diciptakan oleh Allah *Subhanahu wa ta'ala* untuk memenuhi kebutuhan makhluk-Nya, baik itu manusia maupun hewan. *Hydrilla* merupakan salah satu tumbuhan air yang hidup di air tawar dan memenuhi permukaan perairan. Sebagaimana firman Allah dalam potongan ayat al-Qur'an surah al-An'am (6) : 99

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ.....

“dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan.....”

Ayat ini menyebutkan adanya berbagai macam tumbuhan yang diciptakan oleh Allah *Subhanahu wa ta'ala* yang disebutkan pada kalimat “segala macam

tumbuh-tumbuhan”, merupakan keanekaragaman dari segi bentuk ataupun manfaat yang dari masing-masing tumbuhan. Keanekaragaman ini memberi banyak manfaat bagi makhluk lain. Bagi beberapa hewan air, tumbuhan ini telah menjadi tempat berlindung bagi mereka, tempat berkembang biak, dan sebagai sumber makanan.

Pemanfaatan *Hydrilla* oleh beberapa hewan air membuktikan bahwa tumbuhan ini diciptakan oleh Allah *Subhanahu wa ta'ala* dengan membawa manfaat bagi makhluk-Nya. Selain bermanfaat bagi hewan, *hydrilla* juga dapat digunakan sebagai obat karena mengandung steroid, yang memiliki aktivitas antioksidan (Prangdimurti, dkk, 2006; Iswara, 2009; Panjaitan, dkk, 2008). Kandungan antioksidan ini dapat dijadikan sebagai pencegah oksidasi sel di dalam tubuh manusia yang disebabkan oleh radikal bebas, yang dapat menyebabkan berbagai penyakit karsinogenik dan penuaan (Yan, dkk, 1998). Hasil penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dari senyawa steroid pada tanaman *Hydrilla* dengan nilai EC₅₀ sebesar 24,48 ppm, dapat dikatakan bahwa antioksidan dari senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* kuat. Hal ini sesuai dengan firman Allah *Subhanahu wa ta'ala* dalam al-Qur'an surah Shaad (38) : 27.

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا.....

Artinya : “dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang diantara keduanya tanpa hikmah.....”

Ayat ini memberi kabar kepada umat manusia bahwa segala sesuatu yang telah diciptakan oleh Allah *Subhanahu wa ta'ala* mempunyai manfaat atau hikmah yang terkandung di dalamnya. Manfaat tersebut juga terdapat pada penciptaan tumbuhan *Hydrilla*. Salah satunya adalah penelitian tentang

kandungan *Hydrilla* yang dapat dijadikan sebagai obat-obatan. Hadits Rasulullah menyebutkan adanya peluang dari segala penyakit untuk ditemukan obat penawarnya. Seperti hadist yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari di dalam shahihnya, dari sahabat Abu Hurairah bahwasannya Rasul *Shallallahu 'alaihi wa salam* bersabda:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ : مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً. رَوَاهُ أَبُو خَرِيْبٍ

Diriwayatkan dari Abu Hrairah r.a bahwa Nabi *Shallallahu 'alaihi wa salam*. Pernah bersabda “Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit melainkan Allah turunkan pula obatnya” (HR. Al-Bukhari)

Dan dari riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah dia berkata bahwa Rasul *Shallallahu 'alaihi wa salam* bersabda :

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءَ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّوَجَلَّ { رَوَاهُ مُسْلِمٌ }

“Setiap penyakit ada obatnya, bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah subhanahu wa ta'ala” (HR. Muslim).

Adanya peluang dari segala penyakit untuk ditemukan obat penawarnya harus ditindak lanjuti dengan pendekatan ilmiah dan teknologi untuk memperkuat hasil bahwa tumbuhan tersebut benar-benar mengandung beberapa senyawa yang berguna sabagai obat bagi tubuh manusia. Pendekatan ilmiah dan teknologi menghasilkan adanya beberapa penelitian yang telah banyak dilakukan terhadap *Hydrilla*. Hasil dari penelitian tersebut banyak menunjukkan bahwa *Hydrilla* mengandung banyak senyawa kimia yang bermanfaat bagi tubuh manusia.

Penelitian terhadap kandungan *Hydrilla* yang memiliki banyak manfaat menjadikan kita menyadari dan berfikir bahwa sesungguhnya pada penciptaan langit dan bumi terdapat keajaiban-keajaiban di dalamnya dan bukti-bukti atas kekuasaan Allah *Subhanahu wa ta'ala*. Dengan melihat tanda-tanda kekuasaan Allah *Subhanahu wa ta'ala* yang begitu besar, sepatutnya kita harus selalu berfikir dan senantiasa berdzikir kepada Allah *Subhanahu wa ta'ala* dalam keadaan apapun.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan yaitu,

1. Isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata* memiliki aktivitas antioksidan sebesar EC_{50} 24,48 ppm.
2. Hasil identifikasi isolat senyawa steroid *Hydrilla verticillata* dengan UV-Vis, menunjukkan adanya serapan pada panjang gelombang 206, dan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi.
3. Hasil identifikasi isolat senyawa steroid *Hydrilla verticillata* dengan FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi O-H, -CH alifatik, C-H tekuk, C=C non konjugasi, dan C-O alkohol yang diduga merupakan senyawa steroid.
4. Hasil identifikasi isolat senyawa steroid *Hydrilla verticillata* dengan dengan LC-MS/MS menghasilkan dua nilai m/z yaitu 397 dan 395 yang menunjukkan adanya senyawa steroid jenis β -sitosterol dan Stigmasterol.

5.2 Saran

Isolasi senyawa steroid dari *Hydrilla verticillata* perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan penambahan pemisahan kromatografi cair vakum kemudian kromatografi kolom agar pemisahan senyawa yang didapatkan lebih murni. Selain itu penambahan uji antibakteri agar diketahui manfaat lain dari senyawa steroid dan perlu dilakukan identifikasi menggunakan instrument ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR untuk mengetahui eludasi stuktur senyawa yang diisolasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama I., Zainuddin M., dan Rokhati N. 2012. Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida (HCL). *Jurnal Teknik Kimia dan Industri*. Semarang: UNDIP Semarang. Vol. 1. No.1.
- Afif. S. 2013. *Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BLT dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah Euchirum spinosum dari Sumenep Madura*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Al-Iman Jalaluddin Muhammad bin Ahmad bin Muhammad Al-Mahalli dan Al-Imam Jalaluddin Abdirrahman bin Abu Bakar As-Suyuthi. 2010. Tafsir Jalalain. Surabaya. PT. eLBA Fitrah Mandiri Sejahtera.
- Amaliyah S., Khamidah U., Bariyyah S.K., Romaidi. Fasya A. G. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) Pada Tiap Fase Pertumbuhan. *Jurnal Kimia Alchemy*. Vol. 2. No.3.
- Anggraeni O.N. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Mikroalga Chlorella* sp. *Alchemy*. Vol 3. No.2.
- Astuti, M.D., Maulana, A., dan Kuntowati, E.M. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi n-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk.). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. Volume 8, Nomor 2. 53 – 61.
- Bariyah, Siti Khairul. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Dpph Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella* Sp. Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge. *ALCHEMY*, Vol. 2 No. 3 Oktober 2013, hal 150 – 204.
- Bogoriani, N.W. 2008. Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong. *Jurnal Kimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana*.
- Bouzidi, Naima., Yannick Viano., Annick Ortalo-Magne, Halima, Seridi., Zahia Alice., Yasmina, Daghbouche., Gerald, Culioli., Mohammed El Hattab. 2014. Sterol From the Brown Alga *Cystosseria foeniculacea*: Degradation of Fucosterol into Saringosterol epimers. *Arabian Journal of Chemistry*. 50(1): 20-25.
- Byju, K., Anuradha, V., Rosmine, E., Kumar, N. C., & Nair, S. M. (2013). Chemical characterization of the lipophilic extract of *Hydrilla verticillata*: A

widely spread aquatic weed. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(3), 304–311.

Cannel, R.J.P. 1998. *Natural Produk Isolation*. Humana Press, Totowa.

Das, B., Pal, D., & Haldar, A. 2015. Pharmacognostical and Physiochemical Study of the Aquatic Weed *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royale Known as Nutrient Power House. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*.5 (1): 1-5.

Desianti, N., A. Ghanaim F., dan Tri K. A. 2014. *Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga Chlorella sp.* Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Diastuti, H, dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizoporamucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*.21 (4), 266 – 271.

Diaz, B C, A. Segura Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, J. Duran Martos.2007. Separation and Determination of Sterol in Olive Oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 2(1): 593–598.

Dinasti, Anike, Riska. 2016. Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Gandjar, I.G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Gunawan, I. W. G., Bawa, I. G. G., dan Sutrisnayanti, N. L. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Akif Antibakteri pada Herba Meniran (*Phyllanthusniruri* Linn.). *Jurnal Kimia*. Vol. 2 No. 1, hal: 31 – 39.

Hafiz, Nur, M. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform Dan N-Heksana *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab.Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Hanani, E., M. Abdul dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dan *Spons Callispongia sp.* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Kefarmasian*. II (3):127-133.

Hanapi, A., Fasya, A. G., Mardiyah, U., dan Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Euचेuma spinosum* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Alchemy*, 2(2), 126–137. (Auterhoof dan Kovar, 1987).

- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal. Jember. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember. SIGMA. Vol.9 No.1 ISSN 1410-5888.*
- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal SIGMA, Volume 9, Nomor 1, ISSN 1410-5888. Jember: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember. Khasanah, 2018*
- Handoko, Singgih. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella sp.* Dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah dan Kering. *Skripsi. Jurusan Kimis Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.*
- Hasanah, F. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar etanol, Etil Asetat Dan Petroleum Eter *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia Salina Leach*. *Skripsi. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Noviyanti (2010*
- Hidajati, Nurul. Dan Risadatul Amalyah. 2015. Isolasi Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Insektisida Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *UNESA Journal of Chemistry. Vol. 04, no. 1, Hal: 25-30.*
- Ikfi, Sururi. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform Dan N-Heksana *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan. *Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.*
- Imamah N. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maullana Malik Ibrahim Malang.*
- Indrayani L., Soetjipto H., dan Sihasale L. 2006. *Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (Starchytarpheta jamaicensis L. Vahl) terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach Berk. Penelitian. Hayati. Vol. XII:57-61.*
- Ionita, P. 2003. Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species. *Chemical Papers, 59(1), 11–16. Kunchayo, 2007*
- Ionita, P. 2005. Is DPPH Stable Free Radical A Good Scavenger for Oxygen Active Species. *Cem. Pap, 59(1): 11.*
- Iswara, A. (2009). Pengaruh pemberian antioksidan vitamin C dan E terhadap kualitas spermatozoa tikus putih terpapar *Allethri*. *Skripsi. Semarang: Universitas Negeri Semarang. Panjaitan, T. D., Prasetyo, B., & Limantara, L. (2004).*

- Peranan karotenoid alami dalam menangkal radikal bebas. *Universitas Sumatera Utara*, 79–86. Yan, dkk, 1998
- Jain, P. S. and Bari, S. B. 2010. Isolation of lupeol, stigmasterol and campesterol from petroleum ether extract of woody stem of *Wrightia tinctoria*. *Asian J. Plant Sci.* 9: 163-167.
- Jayanti, N.W., Astitu.M.D., Komari, N. dan Rosyidah, K. 2012. Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Aktif dari Ekstrak Metilena Klorida (MTC) Lengkuas Putih (*Alpina galanga (L) Wild*). Vol. 5, No. 2. Hal: 100-108.
- Jung, H. C. dan Wells, W. W. 1997. *Spontaneous Conversion of L-Dehydroascorbic Acid to L-Ascorbic Acid and L-Erythroascobic Acid*. *Biochemistry & Biophysic Article*. 3559-14.
- Khalaf, I. Andreia C., Laurian V., Bianca I., Doina L. 2011. LC/MS Analysis of Sterolic Compounds From *Glycyrrhiza Glabra*. *Jurnal STUDIA UBB CHEMIA, LVI,3 2011* (p. 97-102).
- Khoiriyah, S. Hanapi, A., dan Fasya, A. G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum Vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY. Vol. 3 No. 2*. Hal 133-144.
- Krisna, I. G. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap Difenil Hidrazil (DPPH). *JURNAL KIMIA* 8, 251-256.
- Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T., Bambang, K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kurniawan, M., Munifatul, I., dan Yulita, N. 2010. Kandungan Klorofil, Karotenoid, dan Vitamin C pada Beberapa Spesies Tumbuhan Akuatik. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 18(1): 29, 33-35.
- Kusmiyati, Aznam N., dan Handayani S. 2011. Isolation and Identification of Active Compound Methanol Extract of Curcuma mangga Val Rhizomes of Ethyl Acetate Fraction. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Yogyakarta: Universitas Ahmad Dahlan. Vol. 1, No. 2.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida , Fenilpropanoida dan Alkaloida. *Usu Repository*, 1–25.
- Lopez, Graciliana., Sousa, Carla., Bernardo, Joao., Andrade, P.B., Valentao, P. 2011. Sterol Profiles in 18 Macroalgae of the Portugese Coast. *Journal Phycol*, 5(47): 1210-1218.
- Manoi, F. 2015. Pengaruh Kehalusan Bahan dan Lama Ekstraksi Terhadap Mutu Ekstrak Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. Vol 15 (2): 156-161. Hal: 156-161.

- Mardaneni, I. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Metode KLT dan LC-MS. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Rohman, 2007
- Mardiyah, U., A Ghanaim, F., Begun, F., Suci, A. 2014. Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma Spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Alchemy. Vol 3. No 1: 39-46.*
- Marer, P.J., dan Garvey, K.K. 2001. *Aquatic Pest Control*. USA: University of California. .
- Marliana, E., 2007. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus Ferrugineus* (Zoll 7 Morizi) Benth yang Berfungsi Sebagai Antioksidan. *Jurnal*. Samarinda: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Mulawarman.
- Menteri Kesehatan Republik Indonesia Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 661/MENKES/SK/VII/1994 Tentang Persyaratan Obat Tradisional.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J. dan Breemen, R. B. v. 2013. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Springers*. Hal 949-956. Prangdimurti, dkk, 2006;
- Molyneux, P. 2004. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (Dpph) For Esstimating Antioxidant Activity*. *Songklanarin J. Sci. Technol*, 26 (2), 211-219.
- Mulyani, M., Bustanul A., Hazil N. 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona squamosa* L). *Jurnal Kimia Unand, Volume 2 Nomor 1, Maret 2013.*
- Mustofa. 2008. *Fitofarmaka*. <http://fkuii.org>. Diakses pada tanggal 8 November 2017.
- Nihlati L., Abdul R., Triana H. 2008. *Daya Antioksidan Ekstrak Rimpang Temu Kunci (Boesenbergia pandurata (roxb)) dengan Metode Penangkapan DPPH*. Skripsi Diterbitkan. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). *Skripsi*, Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Pal, D. K., & Nimse, S. B. (2006). Little known uses of common aquatic plant, *Hydrilla verticillata* (Linn . f .) Royle
- Pereira, C. M. P., Nunes, C. F. P., Villeila, L. Z., Streit, N. M., Dias, D., Gomes, C. B., Colepicolo, P. 2016. Ekstraktion of Sterols in Brown Macroalga

from Antarctica and Their Identification by Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Journal Appl Phycol*, DOI 10.1007/s10811-016-0905-5.

Pereira, C. M.P., Nunes, C. F. P., Villela, L. Z., Streit, N. M., Dias, D., Pinto, E., Gomes, C.B., dan Colepicolo, P. 2016. Extraction Of Sterols In Brown Macroalgae From Antarctica And Their Identification By Liquid Chromathigraphy Coupled With Tandem Mass Spectrometry. *J. appl Phycol*.

Pitriyana, Widiyantoro, A. dan Susanti, R. 2017. Karakterisasi Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etil Asetat Bunga Nusa Indah (*Mussaenda erythrophylla*) dan Aktivitas Sitotoksik terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *JKK*. Vol. 6(2). Hal: 83-88. Rahmawati dan Hidjati, 2017

Poedjiadi, A. dan Supriyanti. 2012. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.

Prabha, P., & Rajkumar, J. 2015. Research Article Phytochemical Screening and Bioactive Potential of *Hydrillaverticillata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3): 1809-1815

Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. *Analytical Chemistry Medallion Laboratories: Analytical Progress*, X(2)

Rahmawati, Dwi Anik. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga (*Euचेuma cottoni*) dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang : Universitas Islam Negeri Malang.

Rahmawati, M. dan Hidajati, N. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Kulit BATANG Tumbuhan Mengkudu. *UNESA Journal of Chemistry*. Vol. 6, No. 2. Hal: 113-118.

Ramesh, S., Rajan, R., & Santhanam, R. 2014. *Freshwater Phytopharmaceutical Compounds*. US: CRC Press.

Robertino, I., Widyastuti, S. K. dan Setiasih, N. L. K. 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringga Oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*. ISSN: 2301-7848. Hal: 71-79.

Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.

Rohman, A., Riyanto. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia L.*). *Agritech*, XXV (3): 131-136.

Saleh, C. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalum album Linn*). *Skripsi*. Medan: Universitas Sumatra Utara.

Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.

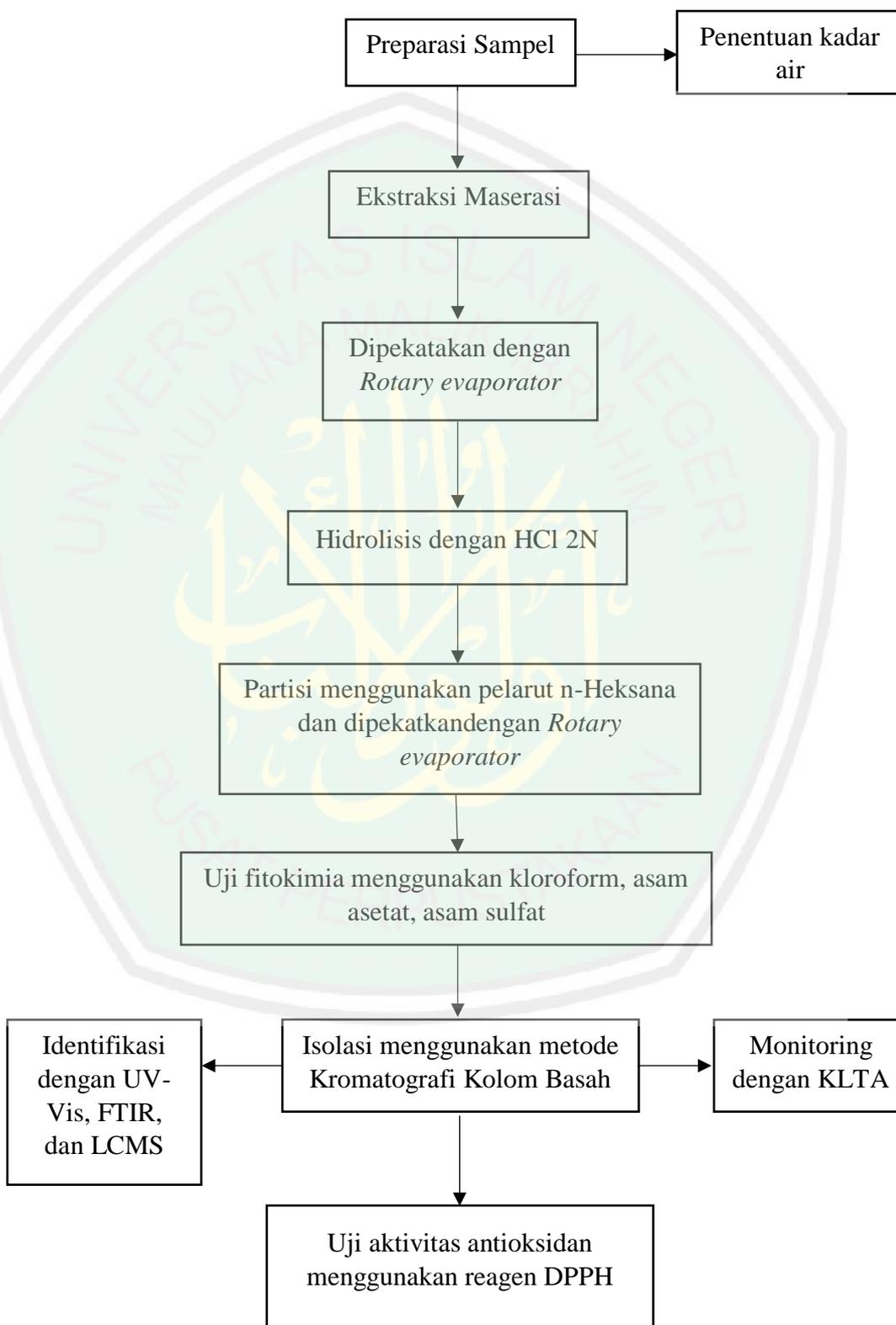
- Shofawie, A. T. 1990. Studi tentang Kemampuan Konsumsi Harian Ikan Koan (*Ctenopharyngodon idella*) terhadap Ganggang (*Hydrilla verticillata*). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Silalahi, J. 2010. Analisis Kualitas Air dan Hubungannya dengan Keanekaragaman Vegetasi Akuatik di Perairan Balige Danau Toba. *Tesis*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sinulingga, S. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid/Triterpenoid dari Akar Tanaman Ekor Naga (*Rhaphidophora Pinnata* Schott). *Skripsi*. diterbitkan. Medan: Program Ekstensi Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts Second Edition*. UK. The University of West London.
- Sukandana I.M. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid pada Ekstrak nHeksana Daun Beringin (*Ficus benjamina* L). *Jurnal Kimia* 5. Bukit Jimbaran: Universitas Udayana.
- Sundari, Ida. 2010. Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus lamk*). *Skripsi*. Surakarta : Universitas Sebelas Maret.
- Tanor, M. N. 2004. *Hydrilla verticillata* sebagai Sumber Hara pada Sistem Budidaya Kacang Tanah. *Eugenia*. 10(1): 92.
- Utama, W. A, Mai. E, Adlis, S. 2013. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Fraksi Aktif Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum Koetjape* Merr) dan Uji Bioaktivitas “Brineshrimps Lethality Bioassay”. *Jurnal Kimia Unand*. 2 (1). ISSN No. 2303-3401.
- Vembriarto, J. 2013. *Kimia Steroid*. Malang : Universitas Negeri Malang.
- Verma, A., Sudhansudhar D., Namrata S. 2013. Spectral Analysis of Steroidal Saponin Isolated and Purified from Leaves Extract of *Asparagus racemosus* (Family-Asparagaceae). *American Journal of Advanced Drug Delivery*. *AJADD* (1) (5) (2013)770-776.
- Voigt, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi 5*, Yogyakarta: Gadjah Mada. University Press.
- Wagner, H. and S. Bland. 1996. *Plant Drug Analysis; A Thin Layer Chromathography Atlas*. 2nd Edition. Berlin Heildeberg: Springer.
- Wahyudi, Setiyono,. A, dan Jayanthi,. W.O. 2014. *Studi Kualitas dan Potensi Pemanfaatan Air Tanah Dangkal di Pesisir Surabaya Timur*. *Explorium*. Vol. 35, No. 1: 43 – 56.

- Wulandari, M., Nora, I., Gusrizal. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana, Etil Asetat dan Metanol Kulit Buah Jeruk Sambal (*Citrus microcarpa Bunge*). *Jurnal JKK*. Volume 2 (2: 90-9).
- Xiao, Y., Wang, Y.-L., Gao, S.-X., Sun, C., & Zhou, Z.-Y. (2007). Chemical Composition of *Hydrilla Verticillata* (L. f.) Royle in Taihu Lake. *Chinese Journal of Chemistry*, 25(5), 661–665.
- Zhang, jian long. dkk. 2012 Steroids With Inhibitory Activity Against the Postate Cancer Cells and Chemical Diversity of Marine Alga *Tydemania expeditions*. *Fitoterapia*. 973-978.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan penelitian



Lampiran 2. Diagram Alir

L2.1. Preparasi *Hydrilla verticillata*

Hydrilla Verticillata

- dicuci dengan air sampai bersih
- diiris kecil-kecil
- dikeringkan tanpa menggunakan sinar matahari
- dihaluskan sampai menjadi serbuk dengan ukuran 90 mesh

Hasil

L2.2. Penentuan Kadar Air

Serbuk *Hydrilla verticillata*

- ditimbang sebanyak 2,5 gram
- dimasukkan kedalam cawan porselen yang sudah dioven
- dioven dan dikeringkan pada suhu 100-105 °C selama ± 15 menit - didinginkan dalam desikator
- ditimbang kembali - diulangi sampai diperoleh berat yang konstan - dihitung dengan persamaan: $\text{Kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\%$

Hasil

L2.3. Ekstraksi *H. verticillata*

Serbuk *H. verticillata*

- ditimbang sebanyak 100 gram
- dimasukkan kedalam erlenmeyer
- direndam dalam 500 mL pelarut metanol selama 24 jam
- dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm
- disaring menggunakan corong buchner
- diambil filtratnya
- dimaserasi kembali ampas yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang agak bening
- digabung keempat filtrat

Filtrat seluruhnya

Ampas

- dipisahkan menggunakan rotary evaporator vacuum

Ekstrak metanol

- ditimbang ekstrak pekat
- dihitung rendemen ekstrak

Hasil

L2.4. Hidrolisis dan partisi

Ekstrak pekat metanol

- ditimbang sebanyak 2,5 gram dan dimasukkan ke beaker glass
- ditambahkan 5 mL asam klorida (HCl) 2 N
- dihidrolisis selama 1 jam menggunakan magnetik stirer hot plate pada suhu ruang

Hidrolisat

- ditambahkan natrium bikarbonat sampai pHnya netral
- dipartisi menggunakan 25 mL n-heksana dengan dua kali pengulangan

Ekstrak

- dipekatkan menggunakan rotary evaporator vakum
- dialiri gas N₂

Ekstrak pekat

- ditimbang
- dihitung rendemennya

Hasil

L2.5. Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Fraksi sampel

- dimasukkan kedalam tabung reaksi
- dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform
- ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat
- ditambahkan 1-2 mL asam sulfat pekat pada dinding tabung
- diamati warna yang terbentuk

Hasil

L2.6. Pemisahan dengan metode Kromatografi Kolom

Ekstrak pekat Fraksi n-heksana

- disiapkan fasa diam kolom silika gel G-60 (0,063-0,200 mm)
- dimasukkan sampel (perbandingan sampel : eluen adalah 1:50)
- dimasukkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat secara gradien dengan perbandingan 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30
- ditampung eluat setiap 2 mL pada botol vial dan dilakukan pengelompokan setiap 5 fraksi
- dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom

Hasil

L2.7. Monitoring dengan KLTA

Fraksi hasil isolasi

- disiapkan eluen campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama 1 jam
- dioven plat KLT pada suhu 100⁰ C selama 30 menit
- ditotolkan masing-masing kelompok fraksi sebanyak 5 kali totalan
- dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- diamati noda yang terbentuk

Hasil

L2.8. Penggabungan vial dan pemekatan

Spot hasil monitoring

- digunting spot dengan Rf yang sama
- disemprotkan pereaksi Liberman-Burchard
- ditandai fraksi yang mempunyai warna hijau
- digabungkan fraksi

Hasil

L2.9. Uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH

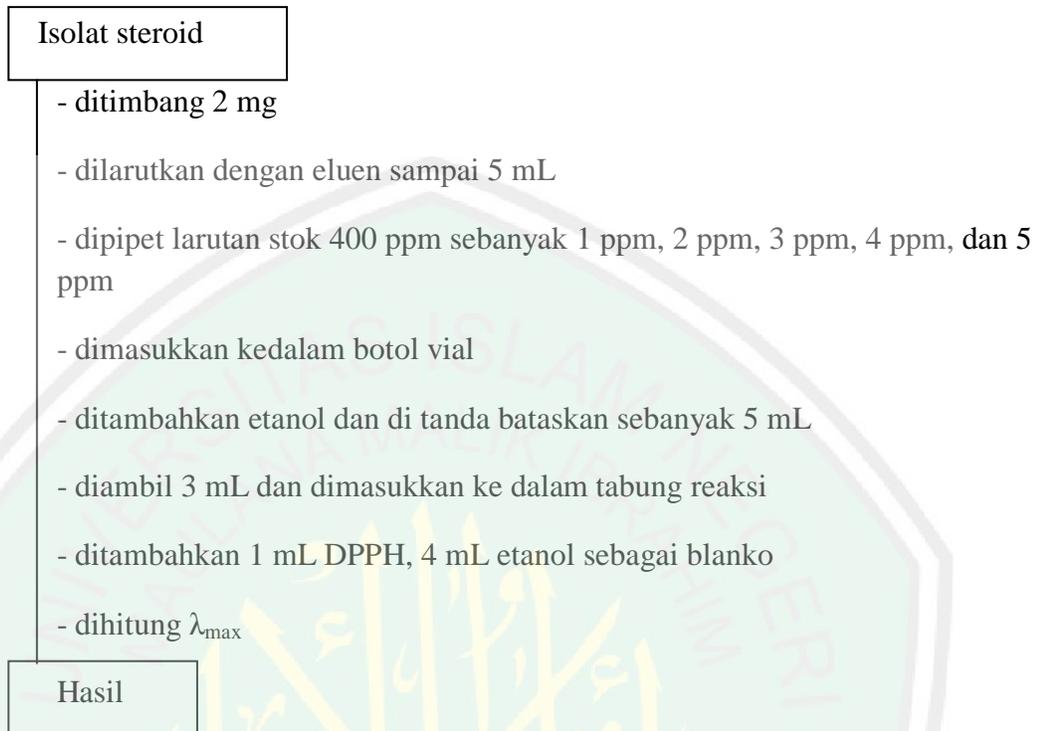
L2.9.1 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Etanol 95%

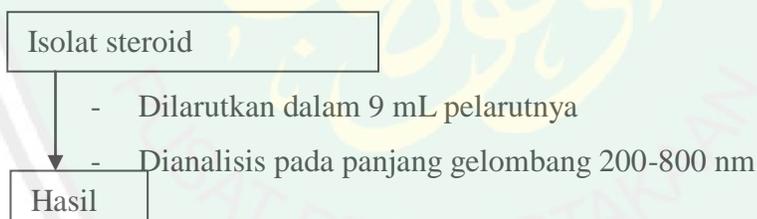
- dipipet sebanyak 4,5 mL
- ditambah larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL
- dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh
- dihitung λ_{\max}

Hasil

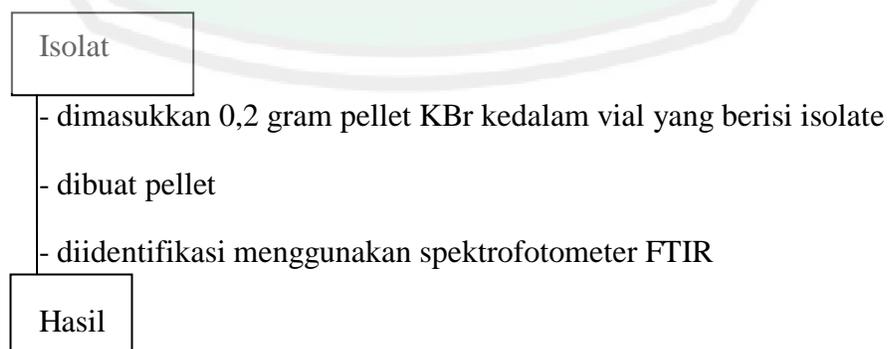
L2.9.2 Uji antioksidan



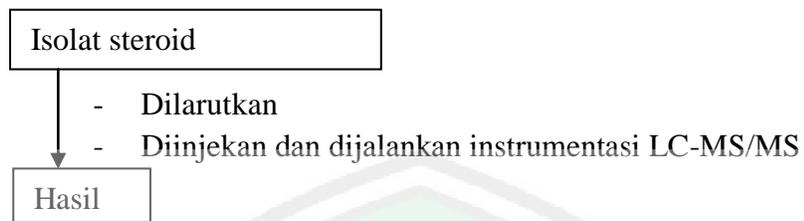
L2. 10. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan UV-Vis



L2.11. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan FTIR



L2. 12 Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS



Lampiran 3. Pembuatan Reagen dan Larutan

L3.1. Pembuatan larutan HCl 2 N

Dimisalkan terdapat 1000 mL larutan stok HCl 37% dengan densitas 1,19 g/cm³, maka massa dari larutan stok tersebut adalah:

$$\rho = \frac{m}{v}$$

$$1,19 \text{ g/cm}^3 = \frac{m}{1000 \text{ mL}}$$

$$\text{Massa} = 1,19 \text{ g/cm}^3 \times 1000 \text{ mL}$$

$$\text{Massa} = 1190 \text{ gram}$$

- a. Penentuan jumlah gram HCl

$$n = \frac{\text{massa}}{Mr}$$

$$n = \frac{12,063 \text{ mol}}{36,5 \text{ gram/mol}}$$

- b. Penentuan mol dari larutan stok HCl 37%

$$M \text{ HCl } 37 \% = \frac{n}{v}$$

$$M \text{ HCl } 37 \% = \frac{12,063 \text{ mol}}{1 \text{ L}} = 12,063 \text{ M}$$

- c. Pengenceran larutan 1 M

$$12,063 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{200 \text{ mL}}{12,063 \text{ mL}} = 16,58 \text{ mL}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 16,58 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L3.2. Pembuatan reagen Liberman-Burchard

- Kloroform p.a 0,5 mL
- Anhidrida asetat 0,5 mL
- Asam Sulfat pekat p.a 1-2 mL

Dimasukkan ekstrak sampel ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambahkan dengan 0,5 mL anhidrida asetat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan keberhasilan terbentuknya reagen Liberman-Burchard.

L3.3. Pembuatan eluen n-heksana : etil asetat

Dibuat eluen untuk elusi pada pemisahan dengan kromatografi kolom dan untuk monitoring KLTA dengan perbandingan n-heksana : etil asetat (4:1) dengan volume total 100 mL.

L.3.3.1 Eluen Kromatografi kolom

- 95:5

$$\text{n-heksana} = \frac{95}{100} \times 100 = 95 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{5}{100} \times 100 = 5 \text{ mL}$$

- 90:10

$$\text{n-heksana} = \frac{90}{100} \times 100 = 90 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{10}{100} \times 100 = 10 \text{ mL}$$

- 85:15

$$\text{n-heksana} = \frac{85}{100} \times 100 = 85 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{15}{100} \times 100 = 15 \text{ mL}$$

- 80:10

$$\text{n-heksana} = \frac{80}{100} \times 100 = 80 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{10}{100} \times 100 = 10 \text{ mL}$$

➤ 75:25

$$\text{n-heksana} = \frac{75}{100} \times 100 = 75 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{25}{100} \times 100 = 25 \text{ mL}$$

➤ 70:30

$$\text{n-heksana} = \frac{70}{100} \times 100 = 70 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{30}{100} \times 100 = 30 \text{ mL}$$

L3.3.2 Eluen monitoring KLTA

➤ Volume n-heksana (18 dalam 20 mL)

$$\text{n-heksana} = \frac{17}{20} \times 100 = 17 \text{ mL}$$

➤ Volume etil asetat (3 dalam 20 mL)

$$\text{Etil asetat} = \frac{3}{20} \times 100 = 3 \text{ mL}$$

L3.4. Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM 20 mL

➤ DPPH 0,2 mM dalam 50 mL etanol

➤ Mr DPPH = 394,33 g/mol

➤ Mol DPPH = 50 mL x 0,2 mM = 50 mL x $\frac{0,2 \text{ M}}{1000}$ = 0,01 mmol

➤ Mg DPPH = 0,01 mmol x Mr DPPH

$$= 0,01 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ g/mol} = 3,9433 \text{ mg}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk DPPH sebanyak 3,9 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 10 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. selanjutnya ditambahkan etanol sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L3.5 Pembuatan larutan stok 400 ppm

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$400 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,005 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 2 \text{ mg}$$

Jadi untuk membuat larutan stok 400 ppm yaitu sebanyak 2 mg isolat dilarutkan dalam 0,005 L/5 mL etanol. Kemudian di vortex hingga homogen.

L3.6 Pembuatan larutan sampel uji aktivitas antioksidan 1,2,3,4, dan 5 ppm

➤ 1 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL}}{400 \text{ ppm}} = 0,0125 \text{ mL} = 12,5 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi untuk membuat larutan 1 ppm yaitu diambil sebanyak 12,5 μL dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut etanol hingga tanda batas.

➤ 2 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL}}{400 \text{ ppm}} = 0,025 \text{ mL} = 25 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi untuk membuat larutan 2 ppm yaitu diambil sebanyak 25 μL dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut etanol hingga tanda batas.

➤ 3 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 3 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{15 \text{ mL}}{400 \text{ ppm}} = 0,0375 \text{ mL} = 37,5 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi untuk membuat larutan 3 ppm yaitu diambil sebanyak 37,5 μL dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut etabol hingga tanda batas.

➤ 4 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 4 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{20 \text{ mL}}{400 \text{ ppm}} = 0,05 \text{ mL} = 50 \mu\text{L}$$

Jadi untuk membuat larutan 4 ppm yaitu diambil sebanyak 50 μL dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut etabol hingga tanda batas.

➤ 5 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL}}{400 \text{ ppm}} = 0,0625 \text{ mL} = 62,5 \mu\text{L}$$

Jadi untuk membuat larutan 5 ppm yaitu diambil sebanyak 62,5 μL dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut etabol hingga tanda batas.

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

L4.1 Data Pengukuran Kadar Air

Berat Cawan Kosong	Ulangan Cawan				Berat Konstan (g)
	Sebelum Dioven	U1	U2	U3	
C1	44,0870	44,0833	44,0824	44,0826	44,0843
C2	41,3260	41,3219	41,3226	41,3224	41,3223
C3	54,2508	54,2487	54,2480	54,2481	54,2480

Berat Cawan + Sampel	Ulangan Cawan				Berat Konstan (g)
	Sebelum Dioven	U1	U2	U3	
C1	45,0809	45,0130	45,0126	45,0128	45,0128
C2	42,3212	42,2598	42,2597	42,2598	42,2598
C3	55,2416	55,1750	55,1755	55,1748	55,1751

1. Kadar air cawan ke-1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum di oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah di oven})}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{(45,0809-45,0128) \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0681 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 6,81 \%
 \end{aligned}$$

2. Kadar air cawan ke-2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum di oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah di oven})}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{(42,3212-42,2598) \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0614 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 6,14 \%
 \end{aligned}$$

3. Kadar air cawan ke-3

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum di oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah di oven})}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{(55,2416-55,1751) \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \%
 \end{aligned}$$

$$= \frac{0,0665 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \%$$

$$= 6,65 \%$$

Kadar air kering rata-rata pada sampel *Hydrilla verticillata* adalah 6,53 %

L4.2 Perhitungan Randemen dan Data

L4.2.1 Ekstrak Metanol

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Randemen (%)
100	147,47	152,53	5,06	5,06

Randemen

$$\text{Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{5,06 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100 \% = 5,06 \%$$

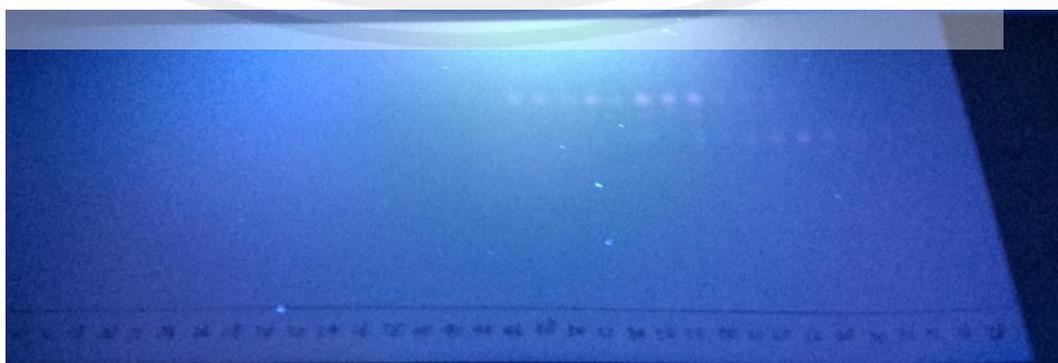
L4.2.2 Hasil Partisi

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Randemen (%)
10	181,110	185,907	4,795	47,95 %

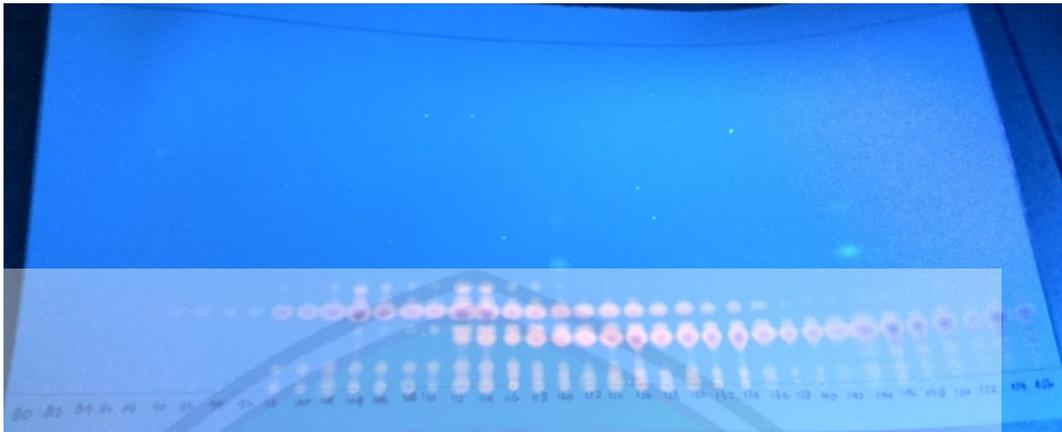
$$\text{Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{4,795 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100 \% = 47,95 \%$$

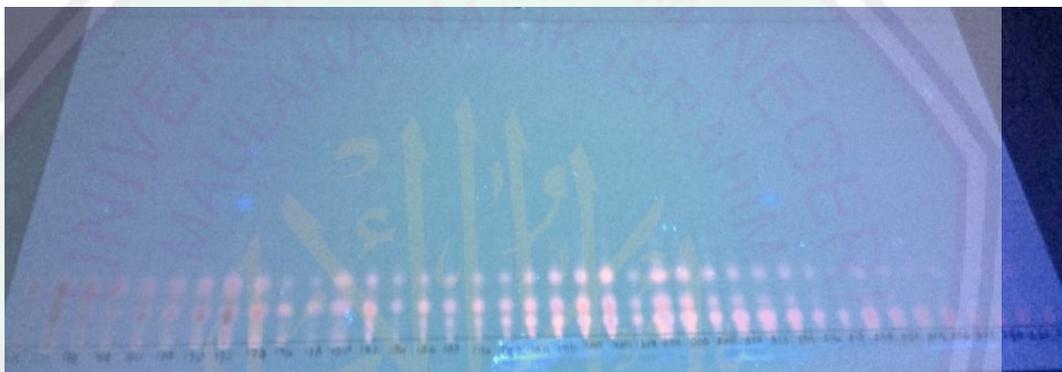
L4.3 Pengelompokan Hasil Monitoring Menggunakan KLTA



Gambar L4.3.1 Monitoring KLTA vial 2 -78 pada 366 nm



Gambar L4.3.2 Monitoring KLTA vial 80 – 156 pada 366 nm



Gambar L4.3.2 Monitoring KLTA vial 158 – 234 pada 366 nm



Gambar L4.3.2 Monitoring KLTA vial 236 – 276 pada 366 nm

No	Vial	Warna UV (254/366 cm ⁻¹)	Jarak senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	R _f	Senyawa	Berat Isolat (mg)
1	11-20	Hitam	6,4	8	0,8	Steroid	20,4
2	44-52	Merah	4,2	8	0,525	Triterpenoid	0,6
3	53-67	Merah	4,2	8	0,525	Triterpenoid	0,4
		Merah	3,5	8	0,4375	Triterpenoid	
4	68-77	Merah	3,5	8	0,4375	Triterpenoid	1
5	96-112	Merah	1,6	8	0,2	Triterpenoid	2,2
6	113-137	Merah	1,6	8	0,2	Triterpenoid	1,8
		Merah	1	8	0,125	Triterpenoid	
7	138-158	Merah	1	8	0,125	Triterpenoid	2
8	159-193	Merah	1	8	0,125	Triterpenoid	2
		Merah	0,6	8	0,075	Triterpenoid	
9	194-214	Merah	1	8	0,125	Triterpenoid	1,1
		Merah	0,6	8	0,075	Triterpenoid	
		Merah	0,3	8	0,375	Triterpenoid	
10	215-233	Merah	1	8	0,125	Triterpenoid	1,6
11	234-276	Merah	0,3	8	0,0375	Triterpenoid	1,6

L4.4 Perhitungan Nilai R_f Hasil Monitoring dan Randemen Isolat Tunggal dan Campuran

4.4.1 Perhitungan Nilai R_f Hasil Monitoring

Nilai R_f isolat steroid dapat dihitung menggunakan rumus dibawah ini :

$$R_f = \frac{\text{Jarak senyawa yang terelusi}}{\text{Jarak pelarut yang mengelusi}}$$

$$R_f \text{ isolat steroid} = \frac{6,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,8$$

4.4.2 Perhitungan randemen Isolat Tunggal dan Campuran

L4.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Konsentrasi	Absorbansi kontrol	Absorbansi sampel	Mean	% Aktivitas Antioksidan
1 ppm	0,4416	0,4322	0,4337	0,79 %
		0,4317		
		0,4372		
2 ppm	0,4429	0,4376	0,4373	1,2643 %
		0,4370		
		0,4375		
3ppm	0,4437	0,4900	0,4902	3,1602 %
		0,4899		
		0,4907		
4 ppm	0,4447	0,4217	0,4220	5,1045 %
		0,4221		
		0,4224		
5 ppm	0,3141	0,3376	0,3378	7,0159 %
		0,3374		
		0,3386		

Nonlin fit of Transform of Exponential decay:Table of results

	Data Set-A	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		Different curve for each data set
Alternative hypothesis		One curve for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		
Preferred model		Models have the same DF
F (DFn, DFd)		Different curve for each data set
Different curve for each data set		
Best-fit values	= 0	
Bottom	= 100	
Top	1.389	
LogEC50	1.621	
HillSlope	24.48	
EC50	= 100	
Span		
Std. Error	0.07137	
LogEC50	0.1504	

HillSlope	
95% CI (profile likelihood)	1.201 to 1.671
LogEC50	1.193 to 2.158
HillSlope	15.9 to 46.93
EC50	
Goodness of Fit	3
Degrees of Freedom	0.9885
R square	0.3143
Absolute Sum of Squares	0.3237
Sy.x	
Constraints	Bottom = 0
Bottom	Top = 100
Top	

One curve for all data sets

Best-fit values	= 0	
Bottom	= 100	
Top	1.389	
LogEC50	1.621	
HillSlope	24.48	1.389
EC50	= 100	1.621
Span		24.48
Std. Error	0.07137	
LogEC50	0.1504	
HillSlope		0.07137
95% CI (profile likelihood)	1.201 to 1.671	0.1504
LogEC50	1.193 to 2.158	
HillSlope	15.9 to 46.93	1.201 to 1.671
EC50		1.193 to 2.158
Goodness of Fit		15.9 to 46.93
Degrees of Freedom	0.9885	
R square	0.3143	3
Absolute Sum of Squares		0.9885
Sy.x		0.3143
Constraints	Bottom = 0	0.3237
Bottom	Top = 100	
Top	LogEC50 is	
LogEC50	shared	
HillSlope	HillSlope is	
	shared	

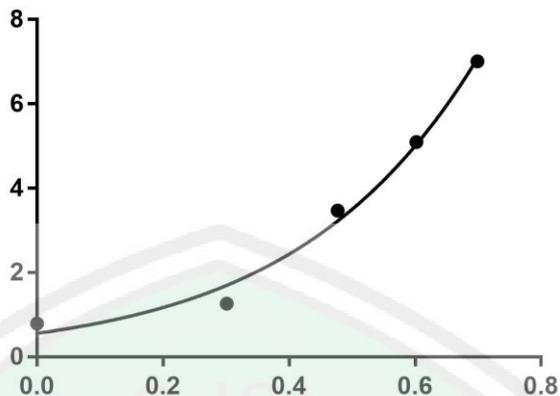
Number of points

of X values

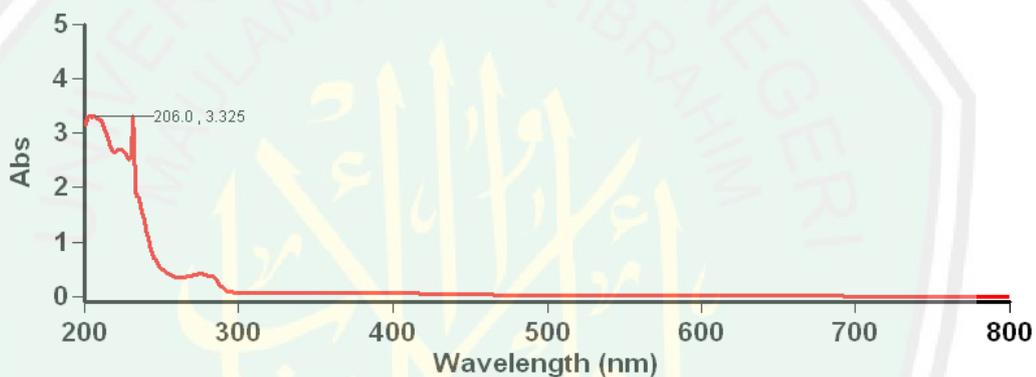
Y values analyzed 15

5

Transform of Exponential decay



L4.6 Hasil Identifikasi Menggunakan UV-Vis Isolat n-Heksana



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 20 Feb 06:04:37 AM 2008

Method:

Batch: D:\Fiddieni\Lamdha Maks Steroid (27-03-2019).DSW

Software version: 3.00 (339)

Operator: isnaeni

Sample Name: steroid

Collection Time

2/20/2008 6:04:47 AM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Maximum Peak

0.0100

799.9nm to 200.0nm

Wavelength (nm)

Abs

206.0

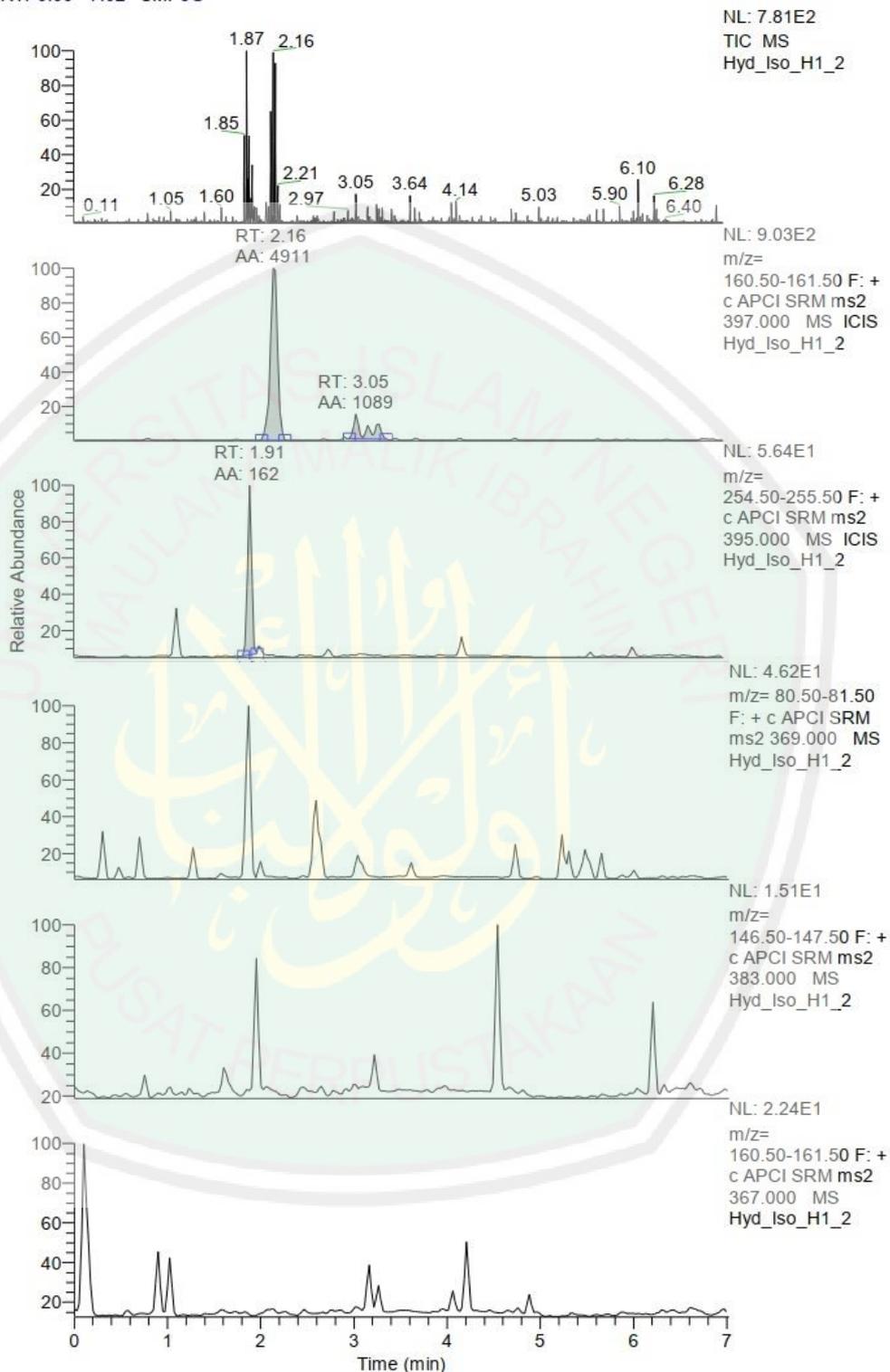
3.325

L4.7 Hasil Identifikasi Menggunakan FTIR Isolat n-Heksana



L4.8 Hasil Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS Isolat n-Heksana

RT: 0.00 - 7.02 SM: 5G



Lampiran 5. Dokumentasi



Hydrilla verticillata Basah



H. verticillata Kering



Serbuk halus *H. verticillata*



Penimbangan cawan kosong



Penimbangan 1 g sampel



Berat konstan kadar air



Penambahan metanol saat Ekstraksi



sampel+metanol dishaker selama 24 jam per 1x ekstraksi



penyaringan hasil shaker



Ekstrak pekat metanol



uji fitokimia steroid (+)



Hidrolisis dengan HCl 2 N



Partisi dengan n-heksana



didapat Fraksi n-heksana pekat



Uji fitokimia steroid (+)



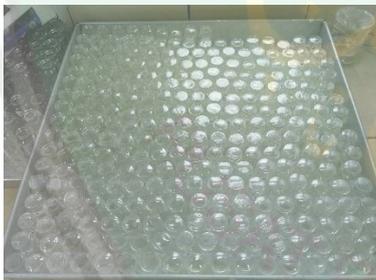
0,067g fraksi untuk Pemisahan kromatografi kolom



Bubur silika sebagai fase diam



Sampel yang telah larut dimasukkan dalam kolom



Vial hasil kromatografi kolom



hasil penggabungan vial



Uji antioksidan sebelum penambahan DPPH (isolat steroid + etanol sebanyak 3 mL)



Uji antioksidan setelah penambahan DPPH